

VERGLEICHENDE UNTERSUCHUNGEN
ÜBER DIE BESTIMMUNG DES SERUM-CHOLESTERINS
MIT HILFE EINER NEUENTWICKELTEN
GASCHROMATOGRAPHISCHEN SOWIE EINER
KOLORIMETRISCHEN UND EINER ENZYMATISCHEN METHODE

THOMAS SCHREYER

1976



Abt. der I. Medizinischen Klinik und Poliklinik der
Königlichen Universität zu Berlin
(Direktor: Prof. Dr. H. F. Wolff)

Digitized by the Internet Archive
in 2026



Aus der I. Medizinischen Klinik und Poliklinik der
Johannes Gutenberg-Universität Mainz
(Direktor: Prof. Dr. H.P. Wolff)

Vergleichende Untersuchungen über die Bestimmung des
Serum-Cholesterins mit Hilfe einer neu entwickelten
gaschromatographischen sowie einer kolorimetrischen
und einer enzymatischen Methode

Inauguraldissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der Medizin der Johannes
Gutenberg-Universität Mainz den Medizinischen Fachbereichen

vorgelegt von

Thomas Schreyer
aus Wiesbaden

Mainz 1976

Gesamtherstellung



DITTERS BÜRODIENST

6501 HEIDESHEIM/RHEIN

AM KAPELLECHEN 1 · RUF 0 6132 / 57 11



Fachbereichsdekan:

Professor Dr. E. Straub

1. Gutachter:

Professor Dr. D. Lommer

2. Gutachter:

Professor Dr. H.P. Wolff

Tag der mündlichen Prüfung: 24.11.1976

Geometrische Optik

1892

Verlag von Julius Springer

Berlin, 1892

Preis 1 Mark

Verlag von Julius Springer



Verlag von Julius Springer

1892

Preis 1 Mark

Verlag von Julius Springer

1892

Preis 1 Mark

Verlag von Julius Springer

1892

Inhaltsverzeichnis

	Seite
I. EINLEITUNG	1
II. AUFGABENSTELLUNG	10
III. THEORETISCHER TEIL	11
A. Allgemeine Bemerkungen zur Bestimmung der Serum-Cholesterinkonzentration	11
B. Herkömmliche Verfahren der Bestimmung der Serum-Cholesterinkonzentration	14
C. Die enzymatische Bestimmung der Serum-Cholesterinkonzentration	27
D. Gaschromatographische Verfahren zur Bestimmung der Serum-Cholesterinkonzentration	35
IV. EXPERIMENTELLER TEIL	44
A. Vorbemerkungen	44
1. Untersuchungsgut	44
2. Präzisionskontrolle	45
B. Durchführung der Methode nach LIEBERMANN-BURCHARD (LB)	46
C. Durchführung der enzymatischen Methode (E)	48
D. Entwicklung und Durchführung der gaschromatographischen Referenzmethode (GC)	50
1. Herstellung des Cholesterin-Heptan-Extraktes	53
a) Angewandtes Verfahren	53
b) Vorversuche, Ergebnisse und Diskussion	55
2. Gaschromatographische Bestimmung der Cholesterin-Konzentration des Heptan-Extraktes	64
a) Angewandtes Verfahren	64
b) Vorversuche, Ergebnisse und Diskussion	67
V. ERGEBNISSE DES METHODENVERGLEICHES	75
A. Präzision	75
1. Freies Cholesterin	75
2. Gesamtcholesterin	77

	Seite
B. Vergleich der Methoden	79
1. Freies Cholesterin	79
2. Gesamtcholesterin	84
a) Vergleich von gaschromato- graphischer Methode (GC) und enzymatischer Methode (E)	89
b) Vergleich von gaschromato- graphischer Methode (GC) und der Methode nach LIEBERMANN-BURCHARD (LB)	91
c) Vergleich von enzymatischer Methode (E) und der Methode nach LIEBERMANN-BURCHARD (LB)	91
VI. DISKUSSION	95
VII. ZUSAMMENFASSUNG	99
VIII. ABKÜRZUNGEN	101
IX. LITERATURVERZEICHNIS	102

I. EINLEITUNG

=====

Die Bedeutung der Bestimmung des Serum-Cholesterinspiegels ist heute unbestritten. In zahlreichen Untersuchungen wurde nachgewiesen, wie schädlich erhöhte Cholesterinwerte sind. Erhöhte Cholesterinwerte können therapeutisch gesenkt werden - nur müssen sie als solche erkannt werden. Dabei handelt es sich um eine Untersuchung, die nicht nur in Kliniken, sondern in jedem Praxislabor durchgeführt werden kann.

In der vorliegenden Arbeit wird über verschiedene Verfahren der Cholesterinbestimmung berichtet, und drei Methoden, die sich prinzipiell unterscheiden, werden miteinander verglichen. Eingangs sei auf die Bedeutung der Cholesterindiagnostik und die Stellung des Cholesterins im menschlichen Organismus hingewiesen.

Eine Erhöhung der Serum-Cholesterinkonzentration gehört zu den wichtigsten Risikofaktoren für Koronarerkrankungen und periphere Verschlusskrankheiten (14,20,21,23,31,42,48,53). Schon vor mehr als 50 Jahren gelang es, bei Kaninchen durch Verfütterung cholesterinreicher Nahrung eine starke Erhöhung des Cholesterinspiegels im Blut und ausgeprägte, der menschlichen Arteriosklerose in vielem ähnliche Gefäßveränderungen zu erzielen. Wiederholungen dieses Experimentes ergaben bei einigen Tieren Gefäßläsionen, die sich von denen bei menschlicher Arteriosklerose kaum unterschieden. Die in den veränderten Gefäßen entwickelten Ablagerungen enthalten - beim Versuchstier wie auch beim Menschen - in der Hauptsache Cholesterin (42,53).

Inzwischen beweisen prospektive Langzeitstudien eine eindeutige positive Korrelation zwischen der Höhe der Serum-Cholesterinkonzentration und der Häufigkeit

koronarer Herzerkrankungen. So ergab z.B. die unter dem Namen "Framingham-Studie" bekanntgewordene Untersuchung, daß bei Männern mit einem Serum-Cholesterinspiegel von mehr als 260 mg% das Infarktrisiko 3,3 mal größer war als bei denen, die nur einen Cholesterinspiegel von 200 mg% hatten (21,31).

Um das Risiko von Koronarerkrankungen wirksam zu verringern, muß dafür Sorge getragen werden, daß der Serum-Cholesterinwert nicht erhöht ist. Zu hohe Werte müssen gesenkt werden. Dies kann in begrenztem Umfang durch Einschränkung des Nahrungscholesterins und entsprechende Diät erreicht werden (18,43,44). Ansonsten steht eine Reihe von Medikamenten zur Verfügung (z.B. Clofibrat), die den Cholesterinspiegel zu senken vermögen. Zu einer wirksamen Prophylaxe der koronaren Herzkrankheit muß also in jedem Fall die Überwachung des Serum-Cholesterinspiegels gehören.

Weiterhin ist bekannt, daß die Cholesterinwerte bei einigen Erkrankungen charakteristisch verändert sind. So findet man z.B. bei Hyperthyreose erniedrigte Werte, dagegen ist der Cholesterinspiegel bei entgleistem Diabetes mellitus, Hypothyreose, nephrotischem Syndrom u.a. deutlich erhöht.

In seltenen Fällen weisen Symptome wie Xanthelasmen, Xanthome, Arcus lipoides u.a. auf eine Hypercholesterinämie hin. Die exakte Diagnose "Hypercholesterinämie" kann klinisch jedoch nicht gestellt werden, sondern muß immer auf dem Laboratoriumsnachweis beruhen.

Cholesterin ist ein Baustein der menschlichen Zellmembran und wird deshalb in allen Geweben angetroffen. Zusätzliche Bedeutung hat es als Vorstufe für die Synthese

von Nebennierenrinden-Hormonen, Sexualhormonen und Gallensäuren. Weiterhin kommt Cholesterin "unphysiologisch" vor in Gallensteinen und als Bestandteil atherosklerotischer Veränderungen der Gefäßwände. Letzteres ist ja, wie eingangs erwähnt, ein Hauptgrund für die Bestimmung des Serum-Cholesterinwertes (61).

Zur Cholesterinbiosynthese sind praktisch alle Körperzellen befähigt. Der größte Teil des im Körper produzierten Cholesterins dürfte allerdings aus Leber und Darmmukosa stammen. Die pro Tag synthetisierte Cholesterinmenge wird auf 1 - 1,5 g geschätzt (61). Ausgangspunkt für den Aufbau des Moleküls ist Azetyl-CoA. Aus drei Molekülen Azetyl-CoA entsteht β -Hydroxy- β -methyl-glutaryl-CoA, das zu Mevalonsäure reduziert wird. Über die Zwischenstufen Isopentenylpyrophosphat, Geranylpyrophosphat und Farnesylpyrophosphat entsteht Squalen. Die nachfolgende Zyklisierungsreaktion führt zum Lanosterin. Oxidative Entfernung der Methylgruppen und Verschiebung der Doppelbindung führt über Zymosterin und Desmosterin schließlich zum Cholesterin.

Schrittmacherenzym der Cholesterin-Biosynthese ist die β -Hydroxy- β -methyl-glutaryl-CoA-Reduktase. Die Aktivität dieses Enzyms wird durch das Syntheseendprodukt Cholesterin gehemmt, allerdings nicht in der Darmmukosa. Das vom Organismus produzierte (endogene) Cholesterin wird zum Teil zum Aufbau der Zellwände und als Grundstoff für weitere Synthesen benutzt; ein anderer Teil findet sich im Blutplasma wieder (6,61).

Der Cholesteringesamtbestand des menschlichen Körpers beträgt 130-150 g (6). Er setzt sich aus dem endogenen und dem mit der Nahrung zugeführten (exogenen)

Cholesterin zusammen.

Es soll hier nicht auf die Theorien der Beeinflussung der Cholesterinsynthese durch die exogene Zufuhr eingegangen werden; vieles spricht für ein teilweises Rückkoppelungssystem. Auf der anderen Seite läßt sich durch entsprechende Diät der Serum-Cholesterinspiegel senken, jedoch nur in der Größenordnung von maximal 30-35 mg% (44).

Cholesterin gehört in die Stoffklasse der Lipide und hier wiederum zu den Steroiden.

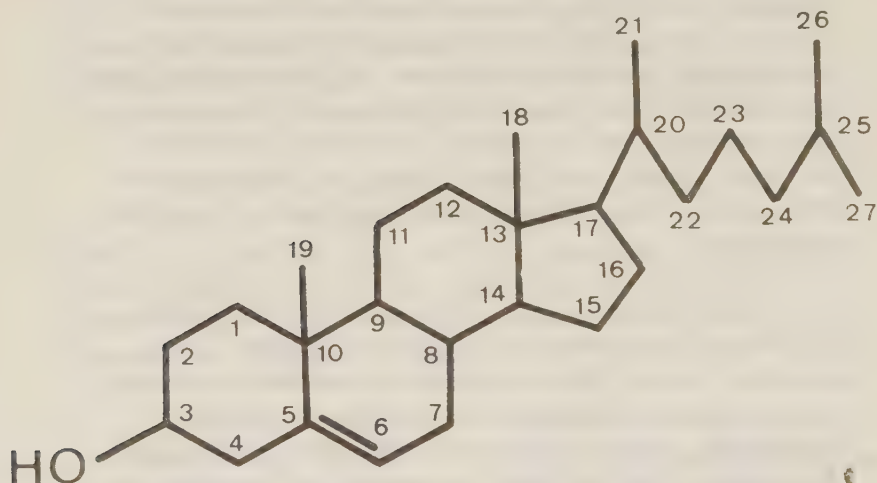


Abbildung 1: Strukturformel des Cholesterinmoleküls

Die Grundstruktur des Cholesterins wird auch Steran genannt und entspricht dem Cyclopentanoperhydrophenanthren. Als Cholestan wird das 10,13-Dimethylsteran mit der Isooctylseitenkette am C-Atom 17 bezeichnet. Der systematische Name für Cholesterin lautet also 5-Cholesten-3 β -ol.

Cholesterin ist als stark lipophile Substanz im Serum praktisch unlöslich. Daß es dort dennoch in einer Konzentration in der Größenordnung von etwa 200 mg% vorkommt, ist deshalb möglich, weil es, wie auch andere Lipide, mit bestimmten Proteinen gut lösliche Komplexe bildet. Die Koppelung von Lipid und Protein wird als Lipoprotein bezeichnet. Man unterscheidet vier Hauptgruppen der Lipoproteine, die elektrophoretisch aufgetrennt werden können. Der Hauptanteil des Serumcholesterins ist in der β -Lipoproteinfraktion enthalten (25).

Wenn vom Serum-Cholesterinspiegel die Rede ist, versteht man darunter im allgemeinen die Konzentration des gesamten im Serum vorhandenen Cholesterins. Dieses liegt zu einem gewissen Prozentsatz als freies Cholesterin vor; das übrige Cholesterin ist mit Fettsäuren verestert. Die Esterbindung erfolgt zwischen der OH-Gruppe am C-Atom 3 und der Säuregruppe der Fettsäure. Aus Tabelle 1 geht hervor, welche Fettsäuren in welchem Ausmaß an der Bildung von Cholesterinestern beteiligt sind.

Tabelle 1: Prozentuale Verteilung der im Serum vorkommenden Cholesterinester (aus RÖSCHLAU et al. (39))

<u>Cholesterinester</u>	<u>Vorkommen im Serum (%)</u>
Myristat	1
Linolat	43
Stearat	3
Palmitoleat	6
Oleat	24
Linoleat	4
Palmitat	10
Arachidat	1
Arachidonat	6

Der Anteil des freien Cholesterins am Gesamtcholesterin liegt im Mittel etwa bei 25 %, der des veresterten Cholesterins folglich etwa bei 75 %. Bestimmt wird dabei jeweils meist das freie Cholesterin; das veresterte ergibt sich dann als Differenz zum Gesamtcholesterin.

Bei schweren Leberschäden ist die Fähigkeit der Leber beeinträchtigt, die Esterbindung zu knüpfen. Es kommt dann zu dem sogenannten Estersturz, einem Abfall des Anteils an verestertem Cholesterin, oder, anders ausgedrückt, einer Zunahme des freien Cholesterins. DAACKE (13) konnte zeigen, daß bei Gesunden die Werte für das freie Cholesterin zwischen 10 % und 80 % des Gesamtcholesterins streuen (s. Abb. 2).

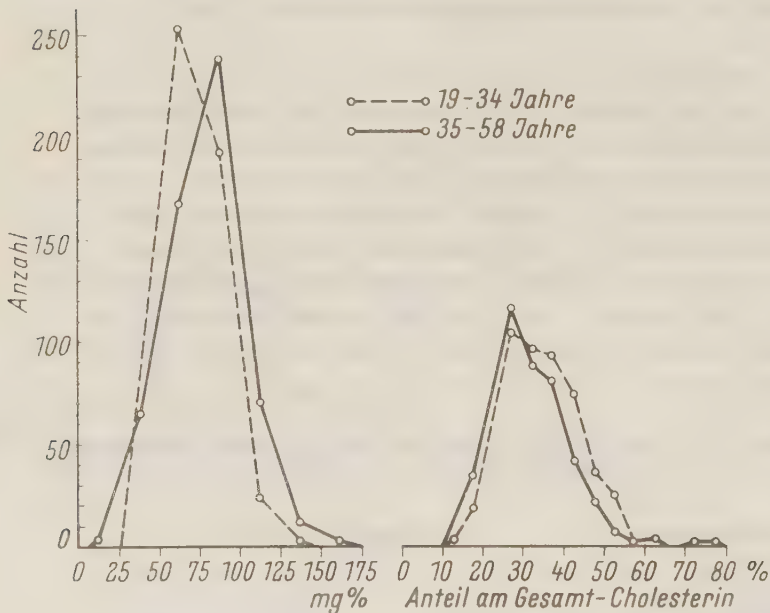


Abbildung 2: Normalwerte für das freie Cholesterin;
Anteil des freien am Gesamtcholesterin
(aus DAACKE (13))

Demnach hat ein hoher Anteil an freiem Cholesterin keinen Krankheitswert. Von Estersturz sollte man nur dann sprechen, wenn ein eindeutiger Abfall des veresterten Cholesterins gegenüber einem früher bestimmten Wert vorliegt.

Bislang wird die Bestimmung des freien Cholesterins selten durchgeführt, da herkömmliche Verfahren sehr aufwendig sind und die Aussagekraft gering ist. Neuerdings ist es möglich, den Gehalt an freiem Cholesterin auf einfache Weise zu ermitteln (enzymatische Methode, s.u.).

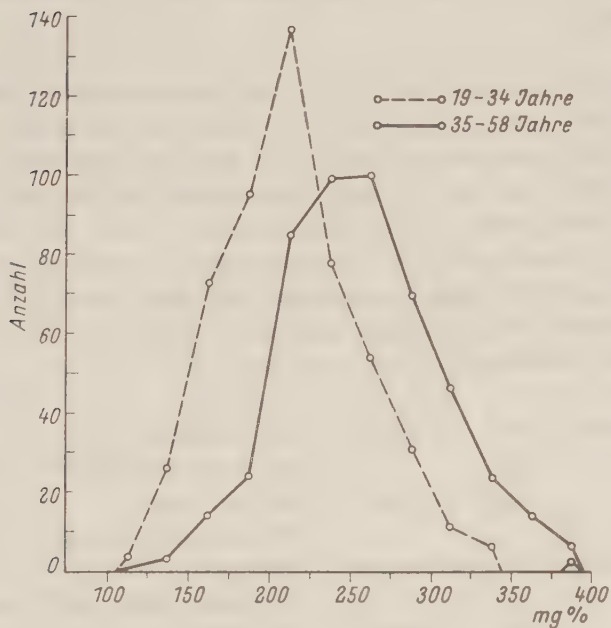


Abbildung 3: Normalwerte für das Gesamt-Cholesterin
(aus DAACKE (13))

Die Angabe von Normalwerten für den Serum-Cholesterinspiegel ist problematisch, da die gefundenen Durchschnittswerte höher liegen als die Idealwerte. Deshalb sind die Angaben über "Normalwerte" unterschiedlich. Die Abbildungen 2 und 3 zeigen die Werte, die bei 1000 gesunden Probanden gefunden wurden.

Als Mittelwert des Gesamtcholesterins wurde für die Altersgruppe 19 - 34 Jahre $215 \text{ mg}\%$ errechnet, für die Altersgruppe 35 - 58 Jahre $257 \text{ mg}\%$. Für das freie Cholesterin betragen die Mittelwerte $69 \text{ mg}\%$ (19 - 34 Jahre) und $78 \text{ mg}\%$ (35 - 58 Jahre). Die Bestimmung erfolgte mit einer Methode modifiziert nach LIEBERMANN-BURCHARD.

Die Bestimmung der Cholesterinkonzentration eines Serums mit unterschiedlichen Methoden liefert Ergebnisse, die - methodisch bedingt - zum Teil erheblich differieren. Von den im experimentellen Teil dieser Arbeit durchgeführten Methoden werden für das Verfahren nach LIEBERMANN-BURCHARD Konzentrationen zwischen 180 und $250 \text{ mg}\%$ als normal angesehen. Bei der neuen, enzymatischen Methode gibt der Hersteller die "vorläufigen Normalwerte" wie folgt an :

Für Männer:	20 - 30 Jahre	bis $260 \text{ mg}\%$	
		Durchschnittswert:	$180 \text{ mg}\%$
	über 30 Jahre	bis $280 \text{ mg}\%$	
		Durchschnittswert:	$215 \text{ mg}\%$
Für Frauen:	20 - 40 Jahre	bis $250 \text{ mg}\%$	
		Durchschnittswert:	$190 \text{ mg}\%$
	41 - 50 Jahre	bis $280 \text{ mg}\%$	
		Durchschnittswert:	$215 \text{ mg}\%$
	über 50 Jahre	bis $330 \text{ mg}\%$	
		Durchschnittswert:	$235 \text{ mg}\%$

Für die gaschromatographische Methode liegen keine Normalwerte vor.

Da die "Normalwerte" folglich von der Methode abhängig sind, ist die Angabe der Serum-Cholesterinkonzentration nur dann voll aussagekräftig, wenn die Bestimmungsmethode bekannt ist.

II. AUFGABENSTELLUNG

=====

Ziel der vorliegenden Untersuchung war:

1. Die Entwicklung einer gaschromatographischen Methode zur Bestimmung des freien und veresterten Cholesterins im menschlichen Serum, die den Anforderungen einer Referenzmethode (absolute Spezifität und sehr gute Präzision) genügt.
2. Der Vergleich einer seit langem routinemäßig angewandten kolorimetrischen und einer neueren enzymatischen Methode der Cholesterinbestimmung miteinander und mit der entwickelten gaschromatographischen Referenzmethode.

III. THEORETISCHER TEIL

=====

A. Allgemeine Bemerkungen zur Bestimmung der Serum-Cholesterinkonzentration

Zur Bestimmung des Serum-Cholesterinspiegels wird heute eine Vielzahl von Methoden verwandt. Das Nebeneinander vieler Verfahren ist Ausdruck des Fehlens einer Methode, bei der hohe Spezifität und Präzision mit einfacher Durchführbarkeit und niedrigen Kosten verbunden sind. Manches spricht dafür, daß die seit 1974 im Handel befindliche enzymatische Methode (Fa.Boehringer, Mannheim) diesen Anforderungen gerecht wird. Dies zu untersuchen war auch Aufgabe der vorliegenden Arbeit.

Generell lassen sich die Bestimmungsverfahren in einstufige und mehrstufige Methoden unterteilen.

Bei der Einstufentechnik wird das Serum direkt in eine der noch zu beschreibenden Farbreaktionen eingesetzt. Auf diesem Prinzip beruhen die meisten der im Handel befindlichen Testpackungen für die routinemäßige Cholesterinbestimmung. Die einstufigen Verfahren sind weniger spezifisch als die mehrstufigen, zeichnen sich dafür aber durch einfache Durchführbarkeit und hohe Präzision aus.

Bei den Mehrstufentechniken wird das Cholesterin in mehreren Schritten aus dem Serum extrahiert und schließlich die Konzentration des Extraktes bestimmt. Auf diese Weise wird eine hohe Spezifität erreicht, allerdings um den Preis eines komplizierten, langwierigen Verfahrens. Deshalb finden Mehrstufentechniken praktisch nur für wissenschaftliche Zwecke Verwendung.

Nach EBERHAGEN (16) läßt sich der Analysengang einer Gesamtcholesterinbestimmung in folgende Einzelschritte aufgliedern:

1. Extraktion der Gesamtlipide aus dem Serum
2. Freisetzung des Cholesterins aus den Cholesterinestern
3. Isolierung des Cholesterins
4. Quantitative Analyse des Cholesterins

Der erste Schritt, die Extraktion der Gesamtlipide aus dem Serum, verfolgt den Zweck,

- a) das Serumwasser zu entfernen, bei dessen Anwesenheit die meisten Meßreaktionen gestört werden
- b) das Cholesterin aus seiner Bindung an die Lipoproteine zu befreien
- c) die Eiweißstoffe abzutrennen, die ebenfalls bei der Isolierung und quantitativen Erfassung des Cholesterins interferieren.

Der zweite Schritt, die Freisetzung des Cholesterins aus den Cholesterinestern, ist dann notwendig, wenn die quantitative Erfassung unspezifisch, also z.B. durch Wägung erfolgt. Sie ist weiterhin notwendig, wenn Cholesterin und Cholesterinester in der eigentlichen Meßreaktion unterschiedliche Farbintensitäten ergeben.

Die anschließende Isolierung des Cholesterins aus dem Verseifungsprodukt ist außer bei den alten gravimetrischen und oxydimetrischen Bestimmungsmethoden auch bei den photometrischen Verfahren notwendig, da die in der Meßreaktion verwandte konzentrierte Schwefelsäure mit den anderen lipoiden Bestandteilen unspezifische Bräunungsreaktionen ergibt.

Zur quantitativen Erfassung werden fast ausschließlich kolorimetrische und fluorometrische Methoden verwandt. Alle anderen Verfahren haben nur noch historisches Interesse oder sind, wie die Gaschromatographie, wissenschaftlichen Referenzmethoden vorbehalten. Die am häufigsten verwandte (kolorimetrische) Methode ist heute immer noch die LIEBERMANN-BURCHARD'sche Methode mit ihren zahlreichen Variationen.

Die eben skizzierten Analysenschritte gelten auch für die Bestimmung des freien Cholesterins, nur entfällt die Spaltung der Cholesterinester.

Für jeden der angegebenen Einzelschritte gibt es jeweils eine Vielzahl von Möglichkeiten. Zur Beschleunigung und Vereinfachung des Arbeitsaufwandes und zur Erhöhung der Präzision wird bei den meisten Verfahren auf einen oder mehrere Analysenschritte verzichtet; dies geht dann natürlich zu Lasten der Spezifität.

Die im Wesentlichen von EBERHAGEN (16) übernommene Tabelle 2 gibt eine Übersicht über den Analysengang bei der Bestimmung des Serum-Cholesterinspiegels.

Tabelle 2: Übersicht über die Möglichkeiten des Analysenganges bei der Bestimmung des Serum-Cholesterinspiegels (nach EBERHAGEN (16))

1. Extraktion der Gesamtlipoide aus dem Serum

- a) Äthanol/Diäthyläther 3:1 (v/v)
- b) Äthanol/Aceton 1:1 (v/v)
- c) Äthanol
- d) Chloroform-Methanol
- e) Isopropanol

2. Freisetzung des Cholesterins

- a) Wäßrige oder alkoholische NaOH bzw. KOH
- b) Na-Äthylat
- c) Benzyltrimethylammoniumhydroxid

3. Isolierung des Cholesterins

- a) Fällung mit Saponinen (Digitonin, Nagitin, Tomatin)
- b) Fällung mit Pyridylsulfonsäure
- c) Fällung als Dibromid
- d) Als "Unverseifbares" durch Extraktion der verseiften Lipide mit hochsiedendem Petroläther
- e) Verteilung in einem biphasischen System
- f) Säulenchromatographische Abtrennung auf Aluminiumoxid
- g) Chromatographische Abtrennung auf Glasfaserpapier
- h) Dünnschichtchromatographische Abtrennung auf Kieselgel
- i) Gaschromatographische Trennung

4. Quantitative Erfassung des Cholesterins

- a) Gravimetrisch
- b) Oxydimetrisch mit Bichromatschwefelsäure und
 - jodmetrischer Titration des überschüssigen Chromats
 - volumetrischer Bestimmung des entwickelten CO_2
 - photometrischer Bestimmung des Farbwechsels
- c) Titration des nach Digitonidfällung verbleibenden Digitoninüberschusses mit einer eingestellten Erythrozytensuspension
- d) Kolorimetrisch nach Umsetzung mit
 - Schwefelsäure
 - Essigsäureanhydrid und konzentrierter Schwefelsäure
 - o-Nitrobenzylchlorid, Eisessig und Zinkchlorid
- e) Fluorometrisch unter Benutzung der Reaktionen 4d
- f) Nephelometrisch
- g) Densitometrisch nach Vortrennung auf
 - Glasfaserpapier
 - Kieselgeldünnschicht
- h) Gaschromatographisch

B. Herkömmliche Verfahren der Bestimmung der Serum-Cholesterinkonzentration

1. Farbreaktionen

Im Jahre 1872 beschreibt SALKOWSKI (40) die Reaktion des Cholesterins mit Chloroform und Schwefelsäure:

"Löst man einige Stäubchen Cholesterin in etwa 1 Cc Chloroform, setzt ein gleiches Volumen concentrirter Schwefelsäure hinzu und erwärmt gelinde zur Beschleunigung der Reaction unter zeitweiligem Schütteln, so nimmt das Chloroform sehr bald eine schön rosaroth oder violette Farbe an."((3) S. 209)

LIEBERMANN berichtet 1885 (29) über die "sehr schöne und scharfe Reaction", die abläuft, wenn einer Lösung von Cholesterin in Essigsäureanhydrid "unter Abkühlen tropfenweis concentrirte Schwefelsäure" zugesetzt wird. "Zuerst wird die Lösung rosaroth, doch verschwindet diese Farbe schnell, namentlich auf Zusatz einer neuen kleinen Menge Schwefelsäure, um einer schönen, ziemlich beständigen Blaufärbung Platz zu machen."((29) S. 1804)

BURCHARD (7) untersuchte, ob es notwendig sei, eine Lösung des Cholesterins in Essigsäureanhydrid anzuwenden, oder ob auch beim Zusatz von Essigsäureanhydrid und Schwefelsäure zu einer Lösung von Cholesterin in Chloroform die Reaction eintrete. Die Antwort fiel positiv aus, ebenso für eine Reihe anderer Lösungsmittel (Amylchlorid, Chlorbenzol, Benzol u.a.), wobei es nur notwendig ist, daß das Lösungsmittel wasserfrei ist. Weiterhin bemerkte BURCHARD, daß bei geringeren Cholesterinkonzentrationen der blaue Farbton allmählich in einen grünen übergeht. BURCHARD versuchte, auf die beschriebene Reaction ein kolorimetrisches Verfahren zu gründen, indem er die Färbung einer genau definierten Cholesterin-Lösung mit unbekannten Lösungen verglich. "Indes verhinderte die starke Färbung von Chloroform-Auszügen tierischer und pflanzlicher Organe den genauen Vergleich mit den Normallösungen, so daß Vf. auf die Bestimmung in denselben verzichten mußte".((7) S.26)

Von den weiteren, später gefundenen Farbreaktionen seien nur die von LIFSCHÜTZ und die von TSCHUGAEFF erwähnt.

LIFSCHÜTZ (30) oxidiert Cholesterin (z.B. mit Eisenchlorid- oder Permanganatlösung) und setzt dem in Eisessig gelösten Oxidationsprodukt in der Kälte einige Tropfen Schwefelsäure zu: Die Lösung ist zunächst "kirsch- bis violettrot", wird nach einigem Stehen "prachtvoll kornblumenblau", um schließlich "rein tiefgrün" zu werden (30) S. 437)

Bei der Methode von TSCHUGAEFF (57) reagieren Acetylchlorid und Zinkchlorid mit dem in Eisessig gelösten Cholesterin unter Ausbildung eines dunkelroten Farbtönen.

Die SALKOWSKI- und die LIEBERMANN-BURCHARD-Reaktion verlaufen nach dem gleichen Prinzip, das Essigsäureanhydrid in der LIEBERMANN-BURCHARD-Probe dient als Verdünnungsmittel für die Schwefelsäure. Die sich entwickelnde Farbe wird durch das Mischungsverhältnis Schwefelsäure : Essigsäureanhydrid beeinflusst. Bei hohem Quotienten entsteht die rosarote bis violette SALKOWSKI-Farbe, bei niedrigem die blaugrüne LIEBERMANN-BURCHARD-Farbe. Essigsäureanhydrid kann durch Essigsäure, Äthylacetat oder Butanol ersetzt werden.

BRIESKORN und CAPUANO (5) erklären den Chemismus der Farbreaktion folgendermaßen: Durch die Einwirkung der Schwefelsäure kommt es unter Dehydratisierung, Dehydrierung und Isomerisierung zur Bildung von Bicholestadien. Werden an das Dien zwei Moleküle Schwefelsäure angelagert, so bildet sich die rote Farbe der SALKOWSKI-Reaktion. Wird die Konzentration der Schwefelsäure durch Essigsäureanhydrid, Eisessig,

Essigester, Butanol herabgesetzt, so wird nur ein Molekül Schwefelsäure angelagert, und es erscheint die grüne Farbe der LIEBERMANN-Reaktion. Beide Nachweisverfahren fallen immer dann positiv aus, wenn in einer Verbindung bereits zwei Doppelbindungen in Konjugation vorliegen oder sich unter der Einwirkung der konzentrierten Schwefelsäure bilden können (5). Allerdings gelang es BRIESKORN und CAPUANO nicht, die grünen bzw. roten Anlagerungsverbindungen aus Bicholestadien plus einem bzw. zwei Molekülen Schwefelsäure darzustellen. Entsprechende Versuche waren positiv bei der Farbreaktion des Triterpens Urolsäure. Deren Dien, die Ursadiencarbonsäure, liefert mit einem bzw. zwei Molekülen Schwefelsäure analytisch faßbare Anlagerungsverbindungen.

Zur Erklärung der Farbreaktionen findet man, auch häufig in der neueren Literatur (11, 16), den Begriff der Halochrome. Darunter werden hochungesättigte, hochmolekulare Kohlenwasserstoffe verstanden, die entstehen sollen, wenn es unter der Einwirkung von konzentrierter Schwefelsäure zur Dehydratisierung, Dehydrierung und Polymerisierung des Cholesterins kommt. Die Annahme, daß die farbigen Reaktionsprodukte halochromer Natur sind, geht auf Beobachtungen von LANGE et al. (28) zurück. Sie haben untersucht, was sich ereignet, wenn man in Chloroform gelöstem Sterin unterschiedliche Mengen Perchlor- oder Hexafluorphosphorsäure zusetzt:

- 1.) Bei Zugabe äquimolarer Menge an Säure fallen farblose kristallisierte Salze aus, mit der Formel Sterin- HClO_4 oder Sterin- HPF_6
- 2.) Zugabe von Wasser hydrolysiert die Salze sofort. Das Sterin kann unverändert wiedergewonnen werden.

- 3.) Zugabe von Säure im Überschuß führt zu einer langsamen Auflösung der Kristalle und der Ausbildung von kräftig violetten halochromen Verbindungen, deren Färbung sich schließlich wieder zurückbildet. Im einzelnen werden folgende Schritte vermutet: a) farbloses Sterin-Salz, b) farbloses Cholestadien, c) instabiles, violettes Halochrom-Salz, d) Bildung eines polymeren, dineoiden Kohlenwasserstoffes, der mit Säureüberschuß ein braunes halochromes Salz bildet.

Nach COOK (35) gibt das eben skizzierte Schema einige Erklärungen zum Farbwechsel während der Reaktion; die nach einiger Zeit erfolgende braun-gelbe Verfärbung wäre dann durch den Polymerisationsprozeß hervorgerufen.

Die Reaktion von Cholesterin mit konzentrierter Schwefelsäure ist in hohem Maße unspezifisch. Neben Cholesterin und Cholesterinestern ergeben auch andere Steroide die gleiche oder ähnliche Farbreaktionen, weiterhin reagieren Carotinoide und Polyenfettsäuren, Mono- und Dihydroxybenzolderivate sowie Isoprenoide, Destillationsrückstände von Petroläther, Essigsäureextrakte von Gummistopfen, sowie Bilirubin und Hämoglobin.

Die Mängel des LIEBERMANN-BURCHARD'schen Verfahrens sind bei der LIFSCHÜTZ-Reaktion weniger ausgeprägt. Das Verfahren weist eine höhere Empfindlichkeit auf, die es gestattet, störende Beimengungen in der Probe stärker hinauszuverdünnen. Weiterhin von Vorteil ist die bessere Farbstabilität und die Tatsache, daß andere Steroide beim Absorptionsmaximum (560 nm) im Vergleich zum Cholesterin geringere Extinktionen ergeben. Die Spezifität der LIFSCHÜTZ-Reaktion ist jedoch nicht größer als bei der LIEBERMANN-BURCHARD-Reaktion, da in beiden Fällen alle phenolischen Gruppen bei der Farbstoffbildung mitwirken.

Bei der TSCHUGAEFF-Reaktion ist das störende Mitreagieren anderer Substanzen vergleichsweise gering.

Zum Zeitpunkt ihrer Beschreibung hatten die aufgeführten Reaktionen nur für die qualitative Analyse Bedeutung. Erst mit Einführung der photometrischen Technik wurden sie zur Grundlage der klassischen Methoden der quantitativen Cholesterinanalyse.

2. Quantitative Methoden

Eine quantitative, gravimetrische Methode der Cholesterinbestimmung wird 1910 von WINDAUS (63) beschrieben. Sie beruht auf der von ihm 1909 gemachten Beobachtung, daß Cholesterin und Digitonin (aber auch andere Saponine) leicht miteinander reagieren:

"Man braucht nur alkoholische Lösungen der beiden Substanzen zusammen zu gießen, und man erhält sofort einen in feinen Nadeln krystallisierenden Niederschlag, der aus einer Verbindung von Digitonin und Cholesterin besteht" ((62) S. 240). Es reagiert jeweils ein Molekül Digitonin mit einem Molekül Cholesterin, wobei die Vereinigung zum "Digitonincholesterid" ohne Austritt von Wasser stattfindet. WINDAUS fand weiterhin, daß Digitonin nur mit freiem, nicht aber mit verestertem Cholesterin einen Niederschlag ergibt, eine Trennung der beiden also durch Digitoninfällung möglich ist. Die Reaktion tritt noch in Cholesterinlösungen von 20 mg% deutlich ein, ist allerdings als qualitative Probe weniger empfindlich als die üblichen Farbreaktionen.

Die Digitonidfällung ist nicht für Cholesterin spezifisch. Neben dem Cholesterin bilden die meisten natürlich vorkommenden Sterine mit β -ständiger OH-Gruppe am C-Atom 3 mit Digitonin unlösliche Verbindungen. Bei der Bestimmung des Serum-Cholesterinspiegels

werden also auch andere Sterine, z.B. Cholestanol, Koprostanol, Desmosterin, Lanosterin miterfaßt. Allerdings kommen diese Verbindungen im Serum nur in geringen Mengen vor.

Zur quantitativen Bestimmung des Cholesterins nach WINDAUS (63) wird das zu untersuchende Material in Äthanol gelöst und solange Digitonin zugegeben, bis kein weiterer Niederschlag entsteht. Das Präzipitat wird mit Äthanol und Äther gewaschen, getrocknet und gewogen. Aus der Menge des Additionsproduktes läßt sich, unter Berücksichtigung der Molekulargewichte von Cholesterin und Digitonincholesterid, die Menge des Cholesterins berechnen.

Die eben beschriebene Methode gilt nur für freies Cholesterin. Bei der Bestimmung des veresterten Cholesterins muß erst die Esterbindung gespalten werden. WINDAUS empfiehlt hierzu alkoholisches Natriumäthylat.

SCHOENHEIMER und DAM fanden ein Verfahren, daß es ermöglichte, Cholesterin nicht als Digitonid, sondern direkt zu bestimmen. "Das Digitonid wird in Pyridin gelöst, in dem es offenbar vollkommen zerfallen ist. Das Digitonin wird dann aus der Lösung mit Äther gefällt und das Sterin bleibt in Lösung." ((46) S. 59) Die Beschaffenheit des verwendeten Digitonins sowie unterschiedliche Digitoninüberschüsse können das Ergebnis der quantitativen Analyse erheblich beeinflussen. Der der Methode anhaftende Fehler wird auf 10 % geschätzt (47).

SCHOENHEIMER und SPERRY gelang es 1934, unter Zuhilfenahme der photometrischen Technik die LIEBERMANN-BURCHARD'sche Farbreaktion und die WINDAUS'sche Digitoninmethode zu einem genauen Bestimmungsverfahren zusammenzufassen (47). Das Prinzip dieser Methode besteht

darin, Cholesterin mit Digitonin zu fällen, das Präzipitat einer Farbreaktion zu unterziehen und es mittels eines Photometers quantitativ zu erfassen. Während bei der gravimetrischen Methode von WINDAUS 15 - 20 ml Serum eingesetzt werden mußten, genügen nun 0,2 ml. Nach der Aufgliederung des Analyse-ganges handelt es sich um ein Vierstufenverfahren (s.S. 11).

Zunächst werden mit einem Äthanol-Aceton-Ge-misch die Gesamtlipide aus dem Serum extrahiert. Zur Bestimmung des Gesamtcholesterins wird eine genau bemessene Menge des Extraktes mit KOH versetzt. Nach der Hydrolyse der Cholesterinester wird das nunmehr nur in freier Form vorliegende Cholesterin mit Digi-tonin gefällt und steht nach einigen Waschvorgängen für die Farbreaktion zur Verfügung. Soll nur das freie Cholesterin bestimmt werden, so entfällt natür-lich die Hydrolyse.

Der getrocknete Cholesterin-Digitonin-Nieder-schlag wird nun in Essigsäure gelöst. Nach Zugabe von Essigsäureanhydrid und konzentrierter Schwefel-säure läuft die bekannte Farbreaktion ab, und die Konzentration kann durch Messung im Photometer er-mittelt werden. Unter den von SCHOENHEIMER und SPERRY beschriebenen Bedingungen erreicht die Färbung nach 27 Min. ihr Maximum, um nach 37 Min. langsam abzu-blassen. Nach 1 bis 2 Stunden ist der grüne Farbton einem gelblich braunen gewichen.

Da die Farbreaktion sehr störanfällig ist (Temperaturschwankungen, Lichteinwirkung, Wasserge-halt der Reagenzien u.a.) ist es notwendig, die Messung im Photometer gegen eine gleichermaßen be-handelte Standardlösung vorzunehmen. Dies gilt grundsätzlich für alle Verfahren, in denen die LIEBER-MANN-BURCHARD'sche Reaktion Anwendung findet.

Ein Vergleich mit der gravimetrischen Methode von WINDAUS (63) zeigt, daß diese durchschnittlich 2 - 5 % höhere Werte liefert. Dies wird darauf zurückgeführt, daß mit Digitonin praktisch alle Sterine gefällt werden, aber nicht alle Sterine Farbreaktionen ergeben (z.B. Dihydrocholesterin).

SPERRY und WEBB veröffentlichen 1950 eine Modifikation der ursprünglichen SCHOENHEIMER-SPERRY-Methode (50). Eine Reihe von Reaktionsbedingungen des ursprünglichen Verfahrens wird verändert, insbesondere bei der Digitoninfällung und der Farbreaktion. Auf diese Weise wird eine größere Genauigkeit erreicht; indes bleibt die ursprüngliche Methode im Prinzip unverändert.

Das von SCHOENHEIMER und SPERRY (47) bzw. SPERRY und WEBB (50) beschriebene Verfahren liefert bei exakter Durchführung der einzelnen Analysenschritte Ergebnisse mit sehr guter Spezifität. Als Vierstufenverfahren ist es jedoch sehr störanfällig und für die Routinebestimmung viel zu aufwendig.

Auf der Suche nach Vereinfachung des Analyse-ganges fanden PEARSON et al. (34) eine rasche und einfache Methode der Bestimmung des Serum-Cholesterins. Sie setzen dem Serum direkt Eisessig, p-Toluol-Sulfonsäure, Essigsäureanhydrid und Schwefelsäure zu und messen die entstehende Farbe bei 550 nm. Das Essigsäureanhydrid extrahiert das Cholesterin, präzipitiert die Eiweiße und sorgt für ein wasserfreies Milieu. Der Zusatz von p-Toluol-Sulfonsäure bringt die im Reaktionsmilieu präzipitierten Proteine wieder in Lösung. Durch die Dehydratisierung und Dispergierung der Eiweiße wird Wärme entwickelt, so daß sich die beim Schwefelsäurezusatz auftretende Erhitzung entsprechend ver-

mindert. Hierdurch wird eine wesentliche Fehlerquelle - die inkonstante Erwärmung - in ihrer Bedeutung vermindert.

Modifikationen der Methode werden von WATSON (59) sowie von RICHTERICH und LAUBER (37) beschrieben, die anstelle der p-Toluol-Sulfonsäure die 2,5-Dimethyl-Benzol-Sulfonsäure verwenden und die Technik des Analysenganges ein wenig verändern. Ebenfalls eng an die Methode von PEARSON angelehnt sind die Verfahren von WRIGHT et al. (65) sowie ZURKOWSKI (68). Letzterer dispergiert die Proteine mittels Sulfosalicylsäure. HUANG et al. (22) sowie NESS et al. (32) konnten zeigen, daß sich die Eiweißausfällung ebenso wie eine unerwünschte, uncharakteristische Farbstoffbildung vermeiden läßt, wenn man, unter Zugabe von Natriumsulfat, das Eisessig-Essigsäureanhydrid-Schwefelsäure-Gemisch sorgfältig aufeinander abstimmt. Bei den meisten der erwähnten neueren Verfahren wird versucht, die einzelnen Reagenzien zu einem mehr oder weniger haltbaren "Cholesterin-Reagenz" zu kombinieren und auf diese Weise den Analysengang auf zwei Pipettierschritte zu reduzieren.

Mit den oben genannten Methoden läßt sich nur das Gesamtcholesterin bestimmen. Eine Verseifung der Cholesterinester ist nicht erforderlich; alle neueren Untersucher haben mit äquimolaren Mengen von Cholesterin und Cholesterinestern praktisch gleiche Extinktionen erhalten (37).

Von Nachteil ist bei den erwähnten Verfahren, daß man bei ikterischen und hämolytischen Seren zu hohe Werte erhält. Bilirubin gibt mit dem Cholesterin-Reagenz eine orange Farbe. Bei Zusatz von Schwefelsäure

bildet sich rasch Biliverdin, das die grüne Liebermann-Burchard-Farbe stört. Eine Korrektur des Bilirubin-Fehlers durch Verwendung von Leerwerten hat sich als unzuverlässig erwiesen (37). Der pro mg% Bilirubin hervorgerufene Fehler wird je nach Methode zwischen 2 und 10 mg% Cholesterin angegeben (16, 24). Ist bei ikterischen Seren eine exakte Bestimmung erwünscht, so kann mit Alkohol-Essigester extrahiert werden und das Cholesterin im Extrakt bestimmt werden (37). KATTERMANN (24) empfiehlt, bei ikterischen Seren auf Methoden mit Digitoninfällung auszuweichen.

Die Schwierigkeiten bei hämolytischen Seren beruhen darauf, daß Hämoglobin durch das Cholesterin-Reagenz und die Schwefelsäure zu braun-schwarzen Pigmenten oxydiert wird. Bei Hämoglobin-Konzentrationen unter 50 mg% entspricht die Extinktionsvermehrung allerdings nur Cholesterin-Konzentrationen unter 5 mg% (37).

Weiterhin muß beachtet werden, daß bei den aufgeführten Methoden das LAMBERT-BEER'sche Gesetz nur für den Bereich zwischen 50 und 400 mg% gilt, Seren mit höheren Cholesterin-Konzentrationen müssen verdünnt werden.

Aufgrund ihrer Einfachheit lassen sich die meisten der nach PEARSON et al. (34) modifizierten Techniken in automatischen Systemen verwenden.

Als Standard- oder Bezugsverfahren zur Cholesterinbestimmung wird in den USA ein Verfahren angesehen, das 1951 von ABELL et al. (1) beschrieben wurde. Hierbei wird dem Serum alkoholische KOH zugesetzt, was eine Freisetzung des Cholesterins von den Lipoprotein-Komplexen sowie eine Spaltung der Cholesterinester zur

Folge hat. Mit Petroläther wird das nunmehr freie Cholesterin aus dem Serum extrahiert und, nach Abdunsten des Petroläthers, mit der LIEBERMANN-BURCHARD-Reaktion bestimmt. Die Verfasser zeigten, daß mehr als 99 % des analytisch bestimmten Materials tatsächlich Cholesterin ist. Die Methode zeigt eine sehr gute Übereinstimmung mit dem Verfahren von SCHOENHEIMER und SPERRY (47).

Auf der LIFSCHÜTZ-Reaktion (30) beruhen Methoden, die von ZLATKIS et al. (67) sowie ZAK et al. (66) entwickelt wurden. Die Vor- und Nachteile der LIFSCHÜTZ-Reaktion wurden bereits oben erwähnt. In zahlreichen Modifikationen wurde die Methode so weit verbessert, daß die LIFSCHÜTZ-Farbreaktion heute fast die Bedeutung der LIEBERMANN-BURCHARD-Reaktion erreicht hat (s.z.B. die Verfahren von WEBSTER (60), FRANNEY und AMADOR (18)).

Die TSCHUGAEFF-Reaktion findet bei einem Verfahren Anwendung, bei dem freies und verestertes Cholesterin mittels Petroläther-Äthermischungen elutionschromatographisch an Aluminiumoxid getrennt wird. SCHÖN und GEY (45) haben dieses Vorgehen beschrieben und die Vorteile gegenüber der LIEBERMANN-BURCHARD-Reaktion herausgestellt.

Bei einem Vergleich der aufgeführten Bestimmungsmethoden müssen verschiedene Gesichtspunkte berücksichtigt werden. Hohe Spezifität und Präzision kann nur mit einem Mehrstufenverfahren erreicht werden. Der damit verbundene zeitliche und finanzielle Aufwand beschränkt die Anwendung der Methode auf wissenschaftliche Fragestellungen. In der Routinediagnostik werden praktisch nur Ein- und Zweistufenmethoden angewandt. Da die Bestimmung des freien Cholesterins nach

der herkömmlichen Methodik ein Mehrstufenverfahren erfordert, verzichtet man meist auf die Ermittlung dieses Parameters, zumal seine klinische Relevanz sehr gering ist.

Vergleichende Untersuchungen haben ergeben, daß die Methoden von SCHOENHEIMER und SPERRY (47) und von ABELL et al. (1) einander entsprechende Werte ergeben, während im Vergleich dazu das Verfahren von PEARSON et al. (34) um 35 mg% und das von ZAK et al. (66) 90 mg% höhere Konzentrationen liefern (16). Laut WEBSTER (59) können bei Zweistufenverfahren, die auf der LIEBERMANN-BURCHARD-Reaktion beruhen, bis um 16 % überhöhte Werte gefunden werden, weil sich unspezifische Chromophoren bilden können.

Bei den meisten der heute käuflichen Reagenzien-sätze liegen unterschiedliche Bestimmungsprinzipien zugrunde. EBERHAGEN (16) untersuchte an einem Poolserum mehrere dieser Test-Kombinationen und fand, daß die Mittelwerte (bei Zehnfachbestimmung) um etwa 20 % differierten.

Die bisweilen sehr starke Streuung der einzelnen Verfahren beruht überwiegend auf ihrer mangelnden Spezifität. Durch entsprechenden experimentellen Aufwand (z.B. Digitoninfällung) läßt sich die Spezifität steigern; indes findet sich unter den herkömmlichen Verfahren keines, bei dem höchst spezifisch Cholesterin allein bestimmt wird.

C. Die enzymatische Bestimmung der Serum-Cholesterinkonzentration

Die aufgeführten Mängel herkömmlicher Verfahren machten es erforderlich, neben immer neuen Modifikationen der LIEBERMANN-BURCHARD'schen Reaktion auch nach neuen Wegen der Bestimmung des Serum-Cholesterinspiegels zu suchen. Bei der großen Bedeutung, die enzymatische Tests mit ihrer hohen Spezifität in der klinisch-chemischen Diagnostik heute erlangt haben, lag es eigentlich auf der Hand, ein enzymatisches Verfahren der Cholesterin-Bestimmung zu entwickeln.

Schon vor mehr als 20 Jahren hatten verschiedene Autoren beschrieben, daß Cholesterin von einigen Erdbakterien oxydiert werden kann (SCHATZ (41); STADTMAN (51)). RICHMOND (35,36) und FLEGG (17) griffen diese Beobachtungen auf und führten, unabhängig voneinander, die Untersuchungen an Nocardia-Bakterien weiter. Es gelang ihnen, das Enzym Cholesterinoxidase zu isolieren und mit ihm Methoden der enzymatischen Cholesterinbestimmung auszuarbeiten. Nach Angaben von RÜSCHLAU et al. (39) gelang es HOLZ et al. ebenfalls, Cholesterinoxidase zu isolieren.

Cholesterinoxidase (von FLEGG (17) noch als "cholesterol-dehydrogenase", von RICHMOND (36) exakt als "cholesterol:oxygen oxydoreductase" (EC 1.1.3.6) bezeichnet) ist das Schlüsselenzym aller enzymatischen Cholesterin-Bestimmungsmethoden. Das Enzym katalysiert die Reaktion

$$\text{Cholesterin} \longrightarrow \Delta^4\text{-Cholestenon.}$$

Bei dem Verfahren von FLEGG (17) wird das Cholesterin mit einem Äthanol-Dioxan-Gemisch extrahiert; die Cholesterinester werden mit KOH verseift. Durch eine geeignete Pufferlösung wird ein pH von 7,2 eingestellt.

Nun wird die gereinigte Enzymaufbereitung zugegeben und bei 37°C inkubiert. Das Reaktionsprodukt Δ^4 -Cholestenon wird mit Isopropanol extrahiert und bei 240 nm gegen einen Leerwert gemessen. Wegen der nur geringen zur Verfügung stehenden Enzymmengen konnte FLEGG seine "cholesterol-dehydrogenase" nicht näher definieren. Er deutet an, daß, sollte sie sich als Oxidase erweisen, das mitentstehende H_2O_2 in der Peroxidase-Reaktion an einen Farbstoff gekoppelt werden könne.

FLEGG weist darauf hin, daß bei der von ihm beschriebenen Reaktion nicht nur Cholesterin, sondern auch ihm ähnliche Sterine umgesetzt werden; dennoch erscheint ihm die Spezifität höher als bei den herkömmlichen Farbreaktionen. Ein Vergleich mit einer Methode nach LIEBERMANN-BURCHARD zeigt, daß beim enzymatischen Verfahren niedrigere Werte gefunden werden. FLEGG will sein Verfahren nur als Diskussionsgrundlage verstanden wissen; der große experimentelle Aufwand und die "enttäuschende" Präzision lassen es als Routineverfahren ausscheiden.

RICHMONT, dessen Arbeit 2 Monate nach der von FLEGG erscheint, weist nach, daß bei der Reaktion Cholesterin Δ^4 -Cholestenon H_2O_2 frei wird, es sich bei dem Enzym also um eine Oxidase handelt (36). Bei dem Verfahren wird im Serum durch alkoholische KOH das Cholesterin von den Lipoproteinen freigesetzt und aus der Esterbindung befreit. Nach Neutralisierung wird das Hydrolysat mit Quecksilberchlorid behandelt, um störende reduzierende Substanzen zu beseitigen, die sich bei der Verseifung gebildet haben. Das freigesetzte Cholesterin, durch Triton X-100 in Lösung gehalten, wird nun zu Δ^4 -Cholestenon oxidiert. Das dabei anfallende H_2O_2 bildet mit

Xylenol Orange und vierwertigen Titanium-Ionen einen Chelat-Komplex, dessen Absorption bei 550 nm gegen einen Leerwert gemessen wird.

RICHMOND's sehr detaillierter Beschreibung der Cholesterinoxidase ist unter anderem zu entnehmen, daß das Enzym spezifisch für Δ^4 - oder Δ^5 - 3β -Hydroxycholestane ist, neben Cholesterin also auch einige andere Sterine bestimmt werden. Der Vergleich mit einem herkömmlichen Verfahren (nach der ABELL-Technik) zeigt, wie schon bei FLEGG, niedrigere Werte für die enzymatische Methode. Bilirubin und Hämoglobin stören den enzymatischen Test nicht, selbst nicht in hohen Konzentrationen.

Ein erheblich verbessertes und vereinfachtes Verfahren wird 1974 von ALLAIN et al. (2) veröffentlicht. Ihnen gelingt es, die Alkali-Verseifung der Cholesterinester durch ein enzymatisches Verfahren zu ersetzen. Drei Enzyme finden Verwendung: Cholesterinesterase spaltet die Cholesterinester in Cholesterin und freie Fettsäuren. Cholesterinoxidase oxidiert Cholesterin zu Δ^4 -Cholestenon. Dabei entsteht H_2O_2 . Peroxidase koppelt H_2O_2 oxidativ mit 4-Aminoantipyrin und Phenol zu Chinonimin-Farbstoff. Die photometrische Bestimmung erfolgt bei 500 nm gegen einen Leerwert. Carbowax-6000 hilft, freies Cholesterin in Lösung zu halten. Natriumcholat wird bei der Hydrolyse der Cholesterinester benötigt. Die Reaktion ist bei 37°C nach 10 Min. vollständig abgelaufen, das farbige Reaktionsprodukt bleibt für mindestens 90 Min. stabil. Die Linearität der Methode geht sicher bis zu einer Konzentration von 600 mg%. Die praktische Durchführung des Verfahrens wird dadurch erleichtert, daß sich bis auf die Cholesterin-

esterase alle anderen beteiligten Substanzen zu einer Reaktionslösung vereinigen lassen, die bei Raumtemperatur (25°C) 8 Stunden haltbar ist.

Bilirubin, Hämoglobin sowie eine Reihe weiterer Serumkomponenten stören auch diesen enzymatischen Test nicht. Besondere Sorgfalt verwenden die Autoren auf die Untersuchung der Spezifität ihrer Methode. Sie prüfen,

Tabelle 3: Vergleich der Substratspezifität bei der Methode von ALLAIN et al. (2) und der Methode von ABELL et al. (1)
(aus: ALLAIN et al. (2))

Sterin	% Sterin gemessen als Cholesterin		fälschlich als Cholesterin bestimmte Substanzen im Normalserum (in mg%)	
	Methode von		Methode von	
	ALLAIN	ABELL	ALLAIN	ABELL
5a-Cholestan-3 β -ol	82	34	4,1	1,7
5,7-Cholestadien-3 β -ol*)	66	160	13,2	32,0
5-Cholesten-3 β -20a-diol	82	46	--	--
7-Cholesten-3 β -ol	80	154	2,4	4,6
Ergosterol	60	130	--	--
	Summe		19,7	38,3
			=====	

in welchem Umfang dem Cholesterin ähnliche Sterine von der Cholesterinoxidase umgesetzt werden und in wie weit sie bei der Referenzmethode von ABELL (1) mitbestimmt werden. Ihre Ergebnisse zeigt Tabelle 3. Von den aufgeführten Substanzen kommen, laut HENRY (19), im Serum natürlicherweise vor: 5a-Cholestan-3 β -ol mit einer

*) in der älteren Literatur auch als 7-Dehydrocholesterin bezeichnet

Konzentration von etwa 5 mg%, 7-Dehydrocholesterin ·) mit etwa 20 mg% und 7-Cholesten-3 β -ol mit etwa 3 mg%. Wegen des Vorkommens dieser Sterine im Serum liefert die Methode nach ABELL um 38 mg% zu hohe Werte; bei der enzymatischen Methode liegen die Ergebnisse immer noch um 20 mg% zu hoch.

In detaillierten Untersuchungen finden SMITH et al. (49) ebenfalls, daß von der Cholesterinoxidase neben Cholesterin eine Reihe weiterer Sterine oxidiert wird.

WITTE et al. (64) vergleichen die Methode von ALLAIN mit mehreren auf der LIEBERMANN-BURCHARD-Reaktion beruhenden Verfahren, darunter auch der ABELL-Methode. Jeder dieser Tests liefert, je nach Spezifität, mehr oder minder höhere Werte als die enzymatische Bestimmung. Die Untersuchung bestätigt weiterhin, daß Hämoglobin und eine Reihe von Medikamenten die enzymatische Analyse nicht stören. Lediglich Bilirubin soll einen leicht positiven Fehler verursachen (1 mg% Bilirubin erscheint als 1-2 mg% Cholesterin).

In Deutschland entwickelten RÖSCHLAU et al. (38) eine Methode, die inzwischen als Testkombination im Handel ist (Fa. Boehringer, Mannheim). Die bei dieser Methode ablaufenden Reaktionen sind in Abbildung 4 skizziert.

·) neuere Bezeichnung: 5,7 Cholestadien-3 β -ol

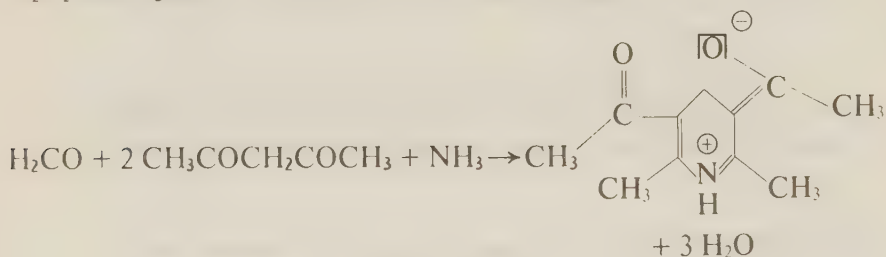
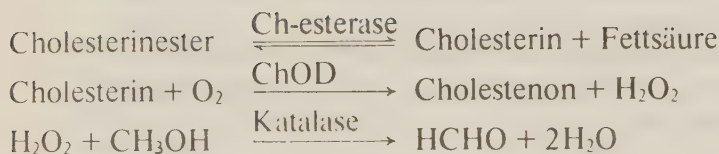


Abbildung 4: Schema des Reaktionsablaufes der enzymatischen Cholesterinbestimmung nach RÖSCHLAU et al. (39)

Die ersten zwei Reaktionsschritte laufen wie bei der von ALLAIN et al. (2) beschriebenen Methode ab. Im nächsten Schritt oxydiert H_2O_2 bei Anwesenheit von Katalase Methanol zu Formaldehyd. Formaldehyd reagiert mit Ammoniumionen und Acetylaceton unter Bildung von 3,5-Diacetyl-1,4-dihydrolutidin, dessen Farbintensität bei 405 nm gemessen wird.

Bei dem entstehenden Dihydrolutidinderivat handelt es sich um eine genau definierte Substanz, so daß die Berechnung über den molaren Extinktionskoeffizienten

durchgeführt werden kann. Unter den Testbedingungen herrscht direkte Proportionalität zwischen der Farbintensität und der Cholesterinkonzentration im Meßbereich 0 - 1000 $\text{mg}\%$.

Mit der Methode kann auch leicht das freie Cholesterin bestimmt werden; dann entfällt natürlich die Zugabe von Cholesterinesterase.

Die für den vollenzymatischen Farbstest notwendigen Reagenzien sind in 4 verschiedenen Lösungen zusammengefaßt, die bei + 4°C mindestens 9 Monate haltbar sind. Hiervon lassen sich wiederum 3 Lösungen zu einem nun allerdings weniger haltbaren Gemisch vereinigen (bei 25°C eine Woche, bei + 4°C einen Monat haltbar). Durch diese Vereinfachungen ist die Methode leicht zu handhaben, pro Bestimmung sind nur 4 Pipettierungen notwendig.

Serumproteine, Bilirubin, Hämoglobin und Pharmaka stören das enzymatische Bestimmungsverfahren nicht. Nach Angaben der Autoren ist die Methode für Cholesterin spezifisch, "da neben Cholesterin in vergleichbaren Konzentrationen keine anderen Sterine oder Steroide vorkommen" ((39) S.6). Diese Aussage steht im Gegensatz zu den Ergebnissen von ALLAIN et al. (2), die gezeigt haben, daß die enzymatische Methode um 20 $\text{mg}\%$ zu hohe Werte liefert.

Ein Vergleich mit der Methode nach ABELL et al. (1) liefert für beide Verfahren gut übereinstimmende Ergebnisse. Beim Vergleich mit einer nicht näher beschriebenen Methode nach LIEBERMANN-BURCHARD ergibt diese um etwa 30 $\text{mg}\%$ höhere Werte. Die Präzision wird von den Autoren als sehr gut bezeichnet. Der Variations-

koeffizient in der Serie liegt bei 2 % ($n=20$), der Variationskoeffizient von Tag zu Tag beträgt ca. 3 % ($n=20$).

Eine eingehende Untersuchung der von RÖSCHLAU et al. (39) entwickelten Methode wird von STÄHLER et al. (52) vorgenommen. Hierin werden die von RÖSCHLAU et al. gemachten Angaben über Präzision und Richtigkeit bestätigt; auch Methodenvergleiche mit der ABELL-Technik und einem (wiederum nicht näher beschriebenen) Verfahren nach LIEBERMANN-BURCHARD liefern fast die gleichen Ergebnisse. Von 53 repräsentativen Medikamenten, Antikoagulantien und Metaboliten wird durch in vivo Versuche nachgewiesen, daß sie die enzymatische Bestimmungsmethode nicht beeinflussen. In der letztgenannten Arbeit wird auf die Veröffentlichung von ALLAIN et al. (2) nicht eingegangen.

Insgesamt gesehen zeichnet sich die enzymatische Methode durch höhere Spezifität und geringere Störanfälligkeit aus. Auch der Wegfall der stark ätzenden Reagenzien bei bisherigen Verfahren ist als Fortschritt zu werten. Die enzymatische Methode liefert niedrigere Ergebnisse als herkömmliche Tests: Dies ist bei der Angabe von Normalwerten zu beachten.

D. Gaschromatographische Verfahren zur Bestimmung der Serumcholesterinkonzentration

Eine hochspezifische Trennung verschiedener, auch sehr eng verwandter Substanzen ist mit der gaschromatographischen Methodik möglich.

Die Grundlage der gaschromatographischen Trennung ist, wie bei anderen chromatographischen Verfahren auch, die Verteilung eines Stoffgemisches zwischen zwei Phasen, von denen die eine unbeweglich (stationär) und die andere beweglich (mobil) ist. Bei der Gas-Flüssigkeitschromatographie (nur sie ist gemeint, wenn im folgenden von Gaschromatographie die Rede ist) ist die stationäre Phase eine Flüssigkeit, die als dünner Film auf einem inerten Trägermaterial mit großer Oberfläche aufgetragen ist. Die mobile Phase ist ein Gas, das kontinuierlich durch diese Packung strömt.

Die Gaschromatographie ist eine Methode zur Trennung flüchtiger Substanzen. Dies erfordert, daß die zu trennenden Substanzen zunächst durch entsprechende Temperaturen in den Gaszustand übergeführt werden, bevor sie von der mobilen Phase, dem Trägergas, durch die Säule befördert werden. Das Trägergas muß inert sein. Das Substanzgemisch wird zwischen dem Trägergas und der nicht flüchtigen Trennflüssigkeit (stationäre Phase) verteilt. Die stationäre Phase hält die einzelnen Probenkomponenten entsprechend ihren Verteilungskoeffizienten selektiv zurück, so daß sich im Trägergas separate Banden bilden. Die auf diese Weise aufgetrennten Komponenten verlassen die Säule im Gasstrom und werden am Ausgang der Säule als eine Funktion der Zeit von einem Detektor registriert. Der Detektor ist über einen Verstärker mit einem Potentiometerschreiber gekoppelt,

der die Ergebnisse in Form eines kontinuierlichen Diagramms aufzeichnet. Die Antwort des Detektors auf eine bestimmte Substanz ist eine Spannungsänderung, die von dem Schreiber als Ausschlag ("Peak") registriert wird. Abbildung 5 zeigt ein typisches Chromatogramm.

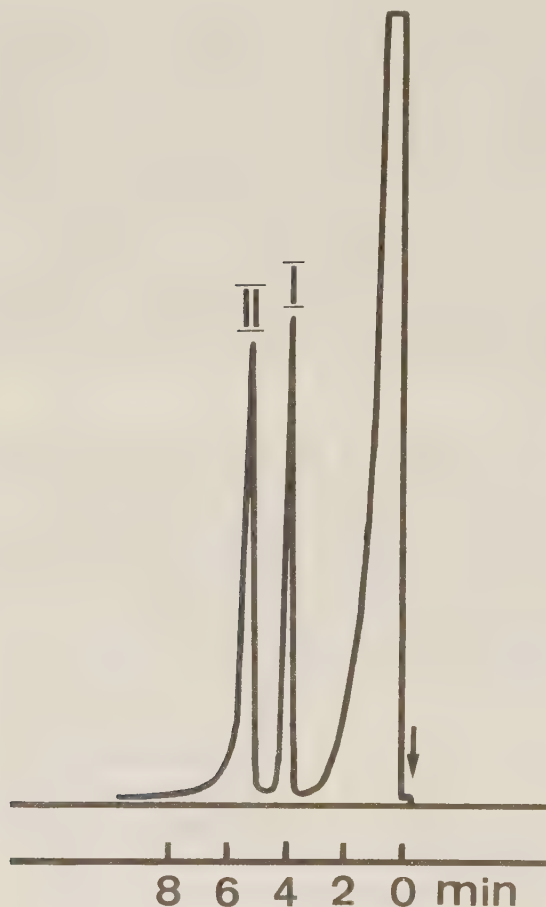


Abbildung 5: Chromatogramm eines Cholesterin-Cholestenon-Gemisches (I = Cholesterin, II = Cholestenon)

Die Retentionszeit wird gemessen vom Zeitpunkt der Einspritzung bis zur Erreichung des "Peak"-Maximums. Diese Größe ist charakteristisch für eine bestimmte Probe und eine bestimmte stationäre Phase bei gegebener Temperatur. Bei genauer Temperatur- und Strömungsregulation kann die Retentionszeit bis auf 1 % genau reproduziert und zur Identifizierung jedes "Peaks" herangezogen werden.

Die Fläche jedes registrierten "Peaks" ist proportional der injizierten Menge der entsprechenden Substanz. Die Fläche kann daher zur genauen Konzentrationsbestimmung jedes einzelnen Stoffes herangezogen werden. Bei schlanken, nahezu symmetrischen "Peaks" besteht auch lineare Abhängigkeit zwischen der "Peak"-Höhe und der Konzentration.

Seit etwa 1960 ist es möglich, Steroidgemische mit Hilfe der Gaschromatographie in ihre einzelnen Bestandteile, darunter Cholesterin, aufzutrennen (3, 55, 56, 58). KUKSIS (26, 27) untersuchte die Darstellung von Cholesterinestern. O'NEILL und GERSHBEIN (33) berichten über eine gaschromatographische Methode zur quantitativen Analyse von Cholesterin und Squalen im Haartalg. In einer Studie über den Argon-Ionisations-Detektor erwähnen SWEELY und CHANG (55), daß eine genaue Bestimmung des Serum-Cholesterinspiegels mit einem gaschromatographischen Verfahren möglich ist.

Die genaue Beschreibung einer gaschromatographischen Methode zur Bestimmung des Serum-Cholesterinspiegels liegt aus dem Jahre 1963 von CAWLEY et al. (9) vor. Sie benötigen für jede Untersuchung 0,5 ml Serum, die, wie bei der ABELL-Methode, zunächst mit alkoholischer KOH versetzt werden. Die Extraktion erfolgt mit Petroläther;

nach Zugabe von destilliertem Wasser erhält man zwei Phasen mit deutlicher Phasengrenze. Ein Aliquot der das Cholesterin enthaltenden Petrolätherschicht wird entnommen; nach Abdunsten des Petroläthers wird der Rückstand in Chloroform gelöst und steht hiermit für die gaschromatographische Bestimmung zur Verfügung.

Zunächst wird eine Eichkurve aufgestellt: Cholesterin-Standardlösungen werden angesetzt, die, die Verdünnung des Serumcholesterins während der Probenaufbereitung berücksichtigend, Serumkonzentrationen von 50, 100, 200, 300, 400, 800 mg% Cholesterin entsprechen. Von jeder Standardlösung werden mehrfach 5 μ l in den Gaschromatographen injiziert. Es zeigt sich, daß die "Peak"-Flächen den injizierten Cholesterinmengen direkt proportional sind. Nun wird von der aufbereiteten Probe 5 μ l in den Gaschromatographen injiziert. Über die "Peak"-Fläche kann aus der Eichkurve die Cholesterinkonzentration ermittelt werden. Die Autoren weisen nach, daß die von ihnen zur Berechnung herangezogenen "Peaks" wirklich Cholesterin repräsentieren: Ähnliche Sterine wie β -Sitosterin, 7-Dehydrocholesterin und Desmosterin haben deutlich andere Retentionszeiten als Cholesterin, so daß sich die "Peaks" gut unterscheiden lassen. Die Vergleichsbestimmung einiger Proben (n=24) mit einer herkömmlichen Methode ergibt für die gaschromatographische Methode durchschnittlich 5 % niedrigere Werte.

Ein ausdrücklich als Referenzmethode ausgewiesenes Verfahren der gaschromatographischen Bestimmung des Serum-Cholesterinspiegels wird 1966 von CURTIUS und BÜRGI (12) veröffentlicht. Sie zeigen, daß unter den beschriebenen Bedingungen die "Peak"-Höhen der injizierten Cholesterinmenge direkt proportional ist, auf die aufwendige Berechnung der "Peak"-Fläche also verzichtet werden kann.

Des weiteren benutzen sie in ihrer Methode einen internen Standard. Dies beinhaltet: Der zur Chromatographie aufgearbeiteten Probe wird eine genau definierte Menge des internen Standards (die Autoren nehmen Cholestan) zugesetzt. Die Injektion in den Gaschromatographen ergibt folglich zwei "Peaks": einen für Cholesterin (=Probe), einen für Cholestan (= interner Standard). Für den internen Standard gilt ebenfalls, daß die "Peak"-Höhe der injizierten Menge direkt proportional ist. Bei Injektion jeweils verschiedener Mengen einer aufbereiteten Probe erhält man für Cholesterin wie für Cholestan jeweils verschiedene "Peak"-Höhen; der Quotient der "Peak"-Höhen Cholesterin/Cholestan einer Probe ist jedoch konstant. Wird Proben unterschiedlicher Cholesterin-Konzentration jeweils die gleiche Menge interner Standard zugesetzt, so ist, wie sich mathematisch leicht nachweisen läßt, das Verhältnis der "Peak"-Höhen direkt proportional den Probenkonzentrationen.

$$mg\% \text{ Cholesterin} = \frac{mg\% \text{ St} \cdot H_x}{H_{\text{St}}} \cdot F$$

- $mg\% \text{ ST}$ = Konzentration des internen Standards
 H_x = "Peak"-Höhe des Cholesterins
 H_{St} = "Peak"-Höhe des internen Standards
 F = Umrechnungsfaktor (= Cholestan/Cholesterin)

Den Faktor F erhält man, indem man eine Lösung mit gleichen Konzentrationen an Cholestan und Cholesterin in den Gaschromatographen injiziert und den Quotienten der "Peak"-Höhen Cholestan/Cholesterin errechnet. Die Anwendung eines internen Standards beinhaltet einige Vorteile: Verdunstung des Lösungsmittels verfälscht das Ergebnis nicht, die zu injizierende Menge muß nicht genau abgemessen werden, und die Injektionen von Standard-Lösungen sind auf solche zur Bestimmung und Kontrolle des Faktors F beschränkt.

Bei der Aufbereitung für die gaschromatographische Bestimmung extrahieren CURTIUS und BÜRGI (12) zunächst das Cholesterin mittels eines Aceton-Alkohol-Gemisches aus dem Serum. Nach Evaporation wird der getrocknete Rückstand zur Hydrolyse der Cholesterinester in methanolischer NaOH gelöst. Nach Zugabe von destilliertem Wasser wird das Cholesterin mit Äther ausgeschüttelt. Der Äther wird abgedampft. Das getrocknete Cholesterin wird in einer genau definierten Menge einer 50 mg%-igen Lösung von Cholestan (interner Standard) aufgenommen und kann nun gaschromatographisch bestimmt werden. Soll nur das freie Cholesterin erfaßt werden, so wird der nach der Extraktion erhaltene Rückstand direkt in der Cholestan-Lösung gelöst.

CURTIUS und BÜRGI vergleichen ihre gaschromatographische Methode mit einer photometrischen Methode mit Digitonidfällung (nach SCHOENHEIMER und SPERRY (47), und SPERRY und WEBB (50) , sowie mit der direkten photometrischen Methode von RICHTERICH und LAUBER (37). Das gaschromatographische Verfahren liefert im Durchschnitt etwa 7 % niedrigere Werte als die Methode mit Digitonidfällung; deren Resultate liegen wiederum etwa 8 % unter denen der direkten Methode. Beim freien Cholesterin sind die Ergebnisse für die Gaschromatographie durchschnittlich 6 % höher als diejenigen der photometrischen Methode. Eine Anwendung der eben beschriebenen Methode in der Routinediagnostik wird durch den relativ großen experimentellen Aufwand verhindert.

Im Gegensatz hierzu wird das von DRISCOLL et al. (15) entwickelte Verfahren routinemäßig zur Bestimmung des Serum-Cholesterinspiegels eingesetzt. Die Methode ist halb automatisiert: Während die Aufbereitung der Proben von Hand erfolgen muß, werden die folgenden

Schritte, also Injektion in den Gaschromatographen, Ausmessen der "Peak"-Höhen und Berechnung der Cholesterinkonzentration von automatisch arbeitenden Systemen erledigt.

Zunächst wird, wie bei ABELL et al. (1) durch Zugabe von alkoholischer KOH zu 0,5 ml Serum eine Befreiung des Cholesterins aus der Lipoproteinbindung und eine Spaltung der Cholesterinester erreicht. Nun wird Heptan hinzugefügt und anschließend, nach heftigem Schütteln, destilliertes Wasser, damit sich eine deutliche Phasengrenze zwischen dem Heptan und der übrigen Lösung ausbildet. Dem Heptan wurde vorher Octacosan als interner Standard zugesetzt. Etwa 0,5 ml des Heptan-überstandes werden in spezielle Probengläschen gegeben; die weitere, gaschromatographische Bestimmung des Heptan-Extraktes erfolgt dann auf automatischem Wege.

Während CURTIUS und BÜRGI bei ihrer Methode eine Retentionszeit für Cholesterin von etwa 10 Min. haben, gelingt es DRISCOLL et al. (15), diese Zeit auf etwa 1 Min. zu reduzieren. Dadurch können 40 Proben pro Stunde gaschromatographiert werden.

Eine Störung der gaschromatographischen Bestimmung kann erfolgen, wenn versehentlich Anteile der alkalischen Alkohol-Wasser-Serum-Lösung in den Gaschromatographen injiziert werden. Bei den hohen Injektor-Temperaturen kann es dann zu einer teilweisen Zersetzung der nachfolgenden Cholesterin-Proben kommen. Die Folge hiervon sind zu kleine "Peak"-Höhen für Cholesterin, während die "Peak"-Höhen des Octacosans nicht beeinträchtigt werden.

Die Autoren wiesen exakt nach, daß die am Detektor erscheinende Substanz wirklich Cholesterin und nicht irgendein Zersetzungsprodukt ist, indem sie - bei

abgeschaltetem Detektor - eine Glaskapillare in den die Säule verlassenden Gasstrom hielten und die entstehenden Abscheidungen infrarotspektroskopisch als Cholesterin identifizierten.

Die Präzision der Methode wird mit 110 ± 7 , 205 ± 10 und 300 ± 10 mg% angegeben. Mit der ABELL-Methode stimmt das Verfahren sehr gut überein, im allgemeinen differieren die Werte um nicht mehr als ± 10 mg%.

Ein sehr ähnliches Verfahren wird von BLOMHOFF (4) beschrieben. Er verwendet ebenfalls äthanolische KOH, nimmt dann aber anstelle von Heptan Hexan. Zur Gaschromatographie wird aber nicht die Hexanlösung verwendet; vielmehr wird, nach Abdunsten des Hexans das Cholesterin von Chloroform aufgenommen, in dem bereits Cholestan als interner Standard gelöst ist.

Der Variationskoeffizient beträgt für die Bestimmung des Gesamtcholesterins 2 - 3 %, für die des freien 3 - 4 %. BLOMHOFF führt einen Methodenvergleich zwischen seinem gaschromatographischen und dem Verfahren von CARR und DREKTER (8) durch. Es handelt sich hierbei um eine Methode, bei der Cholesterin aus dem Serum extrahiert und die Cholesterinkonzentration des Extraktes mittels der LIEBERMANN-BURCHARD'schen Reaktion bestimmt wird. Beim Vergleich der Seren von Patienten ohne Erkrankungen der Leber findet er für die gaschromatographische Methode 10 % niedrigere Werte. Bei der Untersuchung von Seren leberkranker Patienten wächst die Differenz mit steigendem Bilirubingehalt. Bei Seren mit einem Bilirubingehalt von mehr als 10 mg% liegen die gaschromatographisch bestimmten Werte schließlich ca. 30 % unter denen nach CARR und DREKTER ermittelten. Als Vergleichsmethode für das

freie Cholesterin nimmt BLOMHOFf das Verfahren von SPERRY und WEBB (50). Dieses liefert geringfügig höhere Werte als die Gaschromatographie, aber der Unterschied ist nicht signifikant.

Von den zahlreichen Verfahren zur Bestimmung des Serum-Cholesterinspiegels gelingt es bislang nur mit gaschromatographischen Methoden, höchst spezifisch nur Cholesterin zu bestimmen. Allein mit gaschromatographischen Verfahren wird der wahre Cholesteringehalt eines Serums ermittelt; bei allen übrigen Verfahren reagieren mehr oder weniger andere Serumbestandteile mit, so daß die gefundenen Werte höher liegen.

IV. EXPERIMENTELLER TEIL

A. Vorbemerkungen

Der experimentelle Teil der vorliegenden Arbeit wurde in der Zeit von Juli 1974 bis April 1975 durchgeführt. Jede untersuchte Serumprobe wurde dreifach bestimmt; zum Methodenvergleich wurde jeweils der Mittelwert herangezogen. Bei dem automatisierten LIEBERMANN-BURCHARD-Verfahren macht der Automat von jeder Probe Doppelbestimmungen; benutzt wurde der Mittelwert der sechs Konzentrationen.

1. Untersuchungsgut

Die untersuchten Seren sind verschiedener Herkunft: Etwa die Hälfte stammt von freiwilligen, gesunden Probanden; keines dieser Seren hatte einen Cholesteringehalt von mehr als 250 mg% (nach der automatisierten Methode). Die anderen Serum-Proben stammten von stationären Patienten mit bekannter Hypercholesterinämie. Ein sehr geringer Teil der Patientenseren war ikterisch.

Die Blutentnahmen erfolgten zu beliebigen Tageszeiten. Entnommen wurden jeweils 20 - 25 ml Blut, das spätestens nach einer Stunde zentrifugiert wurde. Nach dem Zentrifugieren wurde das Serum für die drei Bestimmungsverfahren wie folgt aufgeteilt:

- drei mal je ca. 0,5 ml Serum in Eppendorf-Reaktionsgefäßen ^{a)} für die automatische Bestimmungsmethode nach LIEBERMANN-BURCHARD (im folgenden als LB abgekürzt)

a) Eppendorf-Reaktionsgefäße Nr. 3810
(Fa. Eppendorf Hamburg)

- ca. 0,5 ml Serum in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß für die enzymatische Methode (im folgenden als E abgekürzt)
- ca. 5 ml für die gaschromatographische Methode (im folgenden als GC abgekürzt)

Die aufgeteilten Serumproben wurden tiefgefroren (-20°C) und erst vor der jeweiligen Bestimmung wieder aufgetaut. Auf diese Weise war eine gleichmäßige Behandlung aller Seren gewährleistet.

Nach Untersuchungen von CLAUDE und BEAUMONT (10) wird durch die Aufbewahrung des Serums bei -20°C die Struktur des Cholesterinmoleküls nicht verändert.

2. Präzisionskontrolle

Bei zahlreichen klinisch-chemischen Routineverfahren, auch der Cholesterinbestimmung, wird Precilip^{R a)} zur Präzisionskontrolle verwandt. Precilip^R ist lyophilisiertes Humanserum. Für Gesamtcholesterin macht der Hersteller folgende Angaben, bezogen auf eine Methode nach LIEBERMANN-BURCHARD^{b)}:

Sollwert: 161 mg%

Streubereich: 145-177 mg%

Dies entspricht einer Streuung von $\pm 10\%$ um den Mittelwert. Die vom Hersteller zugebilligte große Schwankungsbreite ließ uns Precilip^R für unsere Untersuchungen als ungeeignet erscheinen.

Statt dessen wurde Serum einer Blutspende verwendet. Die Blutbank der Universitätskliniken Mainz stellte 250 ml Serum zur Verfügung, das in Portionen à 10 ml aufgeteilt und eingefroren (-20°C) wurde.

a) Fa. Boehringer Mannheim, Best.-Nr.: 15862

b) Fa. Boehringer Mannheim, Best.-Nr.: 15949

B. Durchführung der Methode nach LIEBERMANN-
BURCHARD (LB)

Für den Methodenvergleich wurde aus der Gruppe der herkömmlichen Verfahren das herangezogen, das im hiesigen Zentrallaboratorium der Medizinischen Kliniken für die Routinebestimmung des Serum-Cholesterinspiegels benutzt wurde. Es handelt sich hierbei um eine Modifizierung des von WATSON (59) beschriebenen Verfahrens (über das Prinzip dieser Methode s.S. 23). Mit der Methode ist nur die Bestimmung des Gesamtcholesterins möglich.

Die Analyse erfolgt automatisiert auf einer Braun-Systematik: Das Gerät vollführt alle Pipettierschritte, mißt die Extinktion, berechnet daraus die Konzentration und druckt das Ergebnis aus.

Reagenzien:

- Cholesterin-Reagenz a)
- Schwefelsäure b)
- Cholesterin-Standard c) (161 mg%)

500 ml Cholesterin-Reagenz (Inhalt einer Flasche) werden in einem Erlenmeyer-Kolben oder einem Becherglas vorsichtig unter Kühlung und Rühren mit 55 ml konzentrierter Schwefelsäure versetzt. Bei Raumtemperatur ist das Gemisch (= Lösung 2) eine Woche haltbar. Die Lösung enthält pro Liter:

6,5 M Essigsäure, 6 M Essigsäureanhydrid, 45 mM Dimethylbenzolsulfonsäure, 1,8 M Schwefelsäure.

a) Boehringer Mannheim, Best.-Nr. 15959

b) Schwefelsäure, p.a., konzentriert (Merck Art. 731)

c) verwendet wurde Precilip^R (Fa. Boehringer Mannheim, Best.-Nr. 15862); der Sollwert von 161 mg% wurde eingesetzt

Das zu untersuchende Serum wird in Eppendorf-Reaktionsgefäßen in den Automaten eingebracht (jeweils etwa 0,5 ml). Das Gerät entnimmt hiervon automatisch 0,1 ml Serum, das mit 3,0 ml Lösung 2 zusammengebracht wird. Das Gemisch wird 10 Min. bei Zimmertemperatur (!) inkubiert; schließlich wird die Extinktion im Spektralphotometer bei 570 nm gegen den Reagenzienleerwert gemessen. In die Proben sind in bestimmten Abständen Leerwerte und Standardlösungen eingestreut. Der Automat setzt jeweils folgende Mengen ein:

	Leerwert	Standard	Probe
Standard	-	100 µl	-
Serum	-	-	100 µl
Lösung 2	3,0 ml	3,0 ml	3,0 ml

Bei Verwendung von Precilip^R als Standard ergibt sich die gesuchte Cholesterinmenge x aus der Gleichung

$$\text{mg\% Cholesterin} = 161 \cdot \frac{E_{\text{Probe}}}{E_{\text{Standard}}}$$

$$\text{mg\% Cholesterin} = F \cdot E_{\text{Probe}}$$

Der Faktor F wird zu Beginn des Analysenganges über eine Standardlösung ermittelt. Sein Wert wird am Rechner eingestellt; dadurch wird die Cholesterinkonzentration direkt ausgedruckt. Veränderungen der Extinktion des Standards (und damit auch von F) werden durch die in regelmäßigen Abständen mitbestimmten Standardlösungen bemerkt; gegebenenfalls muß an einem Tag mehrmals ein anderer Wert für F eingestellt werden.

Der Automat macht von jeder Probe Doppelbestimmungen und druckt beide Ergebnisse aus.

Die Messungen für den Methodenvergleich wurden von der zuständigen medizinisch-technischen Assistentin im Rahmen der Routinebestimmungen durchgeführt. Meist wurde an einem Tag nicht mehr als ein Serum (drei Doppelbestimmungen) analysiert. Es versteht sich damit von selbst, daß die nach der eben beschriebenen Methode durchgeführten Bestimmungen den Schwankungen des täglichen Routinebetriebes unterlegen haben (bedingt durch neue Standardlösungen, unterschiedliche Raumtemperatur u.a.).

C. Durchführung der enzymatischen Methode (E)

Zur enzymatischen Cholesterinbestimmung wurde das von RÜSCHLAU et al. (39) entwickelte Verfahren benutzt. Die hierzu notwendigen Chemikalien sind als Test-Kombination ^{a)} im Handel erhältlich. Das Prinzip der benutzten enzymatischen Methode wurde bereits oben beschrieben (s.S. 31).

Reagenzien:

- Lösung 1: 0,6 m Ammoniumphosphat-Puffer, pH = 7;
1,7 m Methanol; 700 U Katalase/ml
- Lösung 2: 0,42 m Acetylaceton; 2,5 m Methanol;
2,1 % Hydroxypolyäthoxydodecan
- Lösung 3: 5 U Cholesterinesterase/ml
- Lösung 4: 2,5 U Cholesterinoxidase/ml

Aus 5 Teilen Lösung 1, 0,25 Teilen Lösung 2 und 0,02 Teilen Lösung 3 wird ein Cholesterin-Reagenz (Lösung 5) hergestellt, das bei + 4°C einen Monat, bei + 25°C eine Woche haltbar ist.

a) Boehringer Mannheim, Best.-Nr. 15738; Kontroll-Nr. der verwendeten Charge: 7364204

Die Messungen erfolgten in einem Photometer der Firma Eppendorf ^{a)} bei einer Wellenlänge von 405 nm. Die verwendeten Küvetten waren Plastik-Einmal-Küvetten ^{b)} mit einer Schichtdicke von 1cm; die Inkubationstemperatur betrug 37°C.

Die einzelnen Analysenschritte zur Bestimmung des Gesamtcholesterins sind in Tabelle 4 zusammengefaßt.

Tabelle 4: Pipettierschema zur Bestimmung des Gesamtcholesterins (nach RÖSCHLAU et al. (20))

	Proben-Leerwert	Probe
Serum	0,02 ml	-
Lösung 5 (Cholesterin-Reagenz)	5,00 ml	-
Inhalt der Reagenzgläser gut mischen		
Lösung 4 (Cholesterin-oxidase)	-	0,02 ml
aus dem Reagenzglas des Probenleerwertes abpipettieren	-	2,50 ml
gut mischen, Proben-Leerwert und Probe mindestens 60 Min. bei 37°C inkubieren. Extinktion der Probe gegen Probenleerwert messen: E_{Probe}		

Die Berechnung der Cholesterin-Konzentration c erfolgte nach der Formel

$$c \text{ (mg\%)} = 1311 \cdot E_{\text{Probe}} \text{ (mg\%)}$$

a) Eppendorf-Photometer 1101 M (Fa. Netheler und Hinz GmbH, Hamburg)

b) Fa. Sarstedt, Nr. 45/1010

Für die Bestimmung des freien Cholesterins durfte das Cholesterin-Reagenz (Lösung 5) natürlich keine Cholesterinesterase enthalten. Ansonsten wurde wie zur Bestimmung des Gesamtcholesterins vorgegangen.

Die Bestimmungen wurden über den gesamten Versuchszeitraum verteilt durchgeführt, meistens in Gruppen von 6 oder 12 Proben. Jedes Mal erfolgte eine Präzisionskontrolle.

D. Entwicklung und Durchführung der gaschromatographischen Referenzmethode (GC)

Für die gaschromatographische Bestimmung wurde ein Verfahren entwickelt, das wesentliche Elemente der von DRISCOLL et al. (15) beschriebenen Methode enthält (s.S. 40). Die Herstellung des Cholesterin-Heptan-Extraktes erfolgte praktisch wie von DRISCOLL angegeben. Zusätzlich wurde dem zu untersuchenden Serum eine Spurendosis ^3H -Cholesterin als Verlustindikator zugesetzt, um den während der Probenaufbereitung entstehenden Verlust zu korrigieren. Die gaschromatographische Bestimmung des Cholesterin-Gehaltes der n-Heptan-Lösung wurde - im Gegensatz zu DRISCOLL - ohne internen Standard durchgeführt.

Die wesentlichen Schritte des angewandten gaschromatographischen Verfahrens sind in dem Schema der Abbildung 6 zusammengefaßt.

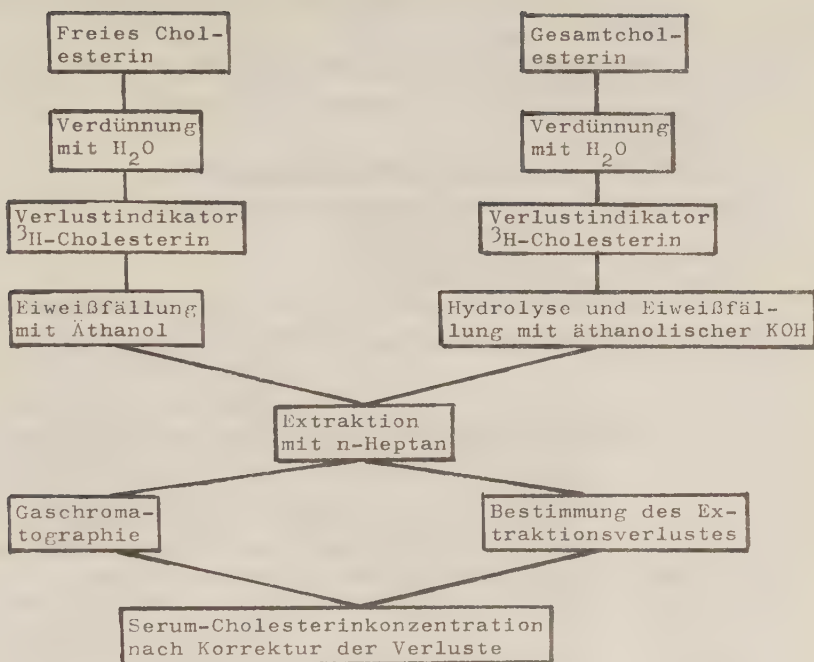


Abbildung 6: Schema der gaschromatographischen Bestimmung des Serum-Cholesterinspiegels

Chemikalien: Aceton p.a. (Merck, Art. 14)
 Äthylalkohol 96 %, rein (Apotheke der Universitätskliniken), vor Gebrauch destilliert
 Cholesterin, A grade (Calbiochem, Nr. 2281)
³H-Cholesterin (New England Nuclear,
 NET-139 (Cholesterol-1, 2-³H, 40-60 Ci/mM)
 n-Heptan (Merck, Art. 4379)
 KOH p.a. (Merck, Art. 5021)

HOPO (1,4-Bis-(4-methyl-5-phenyl-2-oxazolyl)-benzol) (Merck, Art. 7249)
PPO (2,5-Diphenyloxazol) (Merck, Art. 2964)
Toluol p.a. (Merck, Art. 8325)

Reagenzien: alkoholische Cholesterinlösung:

1 mCi ^3H -Cholesterin (0,0091 mg) in
500 ml Äthanol

alkoholische KOH:

6 ml einer 33 g% KOH + 94 ml Äthylalkohol

Cholesterinstandard: Stammlösung von 750 mg
Cholesterin in 500 ml
Heptan,
davon Verdünnungsreihe:
150, 125, 100, 75, 50, 37, 5, 25, 12,5 mg%
Da das Cholesterin während der Probenaufbe-
reitung 1:2 verdünnt wird, entsprechen die
Standardlösungen (im folgenden St abgekürzt)
jeweils den doppelten Konzentrationen. In
der St 300 sind also nur 150 mg% enthalten.

Szintillationsflüssigkeit: 0,4 % PPO,
0,01% HOPO in
Toluol

Geräte:

Gaschromatograph: Benutzt wurde ein Gaschro-
matograph der Firma
Becker Delft, Model Nr. 419

Maße der Glassäule: Länge 105 cm
Innendurchmesser 2 mm

Füllmaterial: Chromosorb W-AW-DMCS 100/120
mesh beladen mit 3 % OV-1
(Silicongummi)

Jede neue Säule wurde vor Gebrauch 24
Stunden bei 300°C konditioniert.

Detektor: Flammenionisationsdetektor
Wasserstoff-Flußgeschwindigkeit
30 ml/Min.

Preßluft-Flußgeschwindigkeit
300 ml/Min.

Trägergas: Stickstoff; Flußgeschwindigkeit
40 ml/Min.

Säulentemperatur: 260°C

Injektor- und Detektortemperatur: 290°C

Unter diesen Bedingungen beträgt die Reten-
tionszeit für Cholesterin 2 Min. 40 Sek.

Hamilton-Mikroliter-Spritze, 10 μ l, auf 0,1 μ l
graduier

Liquid Scintillation Spectrometer, Model 3380
(Fa. Packard Instruments)

Meßgläschen für den Liquid Scintillation
(Fa. Packard Instruments)

Mixomat (Fa. Boskamp)

Pipetten: automatische Eppendorf-Pipetten
für 50 μ l und 500 μ l
Stangenpipetten mit ausgezogener
Spitze für 1,0 ml, 2,0 ml und
5,0 ml

Tischrechner HP 9820 A (Fa. Hewlett Packard)

1. Herstellung des Cholesterin-Heptan-Extraktes

a) Angewandtes Verfahren

In ein Reagenzglas wurde 0,5 ml Serum pipettiert.
Hierzu wurde 1,0 ml Aqua dest. gegeben und gut ge-
schüttelt (Mixomat).

Mit einer Eppendorf-Pipette wurden 50 μ l der
äthanolischen ^3H -Cholesterinlösung hinzugegeben, und
es wurde gut durchgemischt. Im gleichen Arbeitsgang
wurden 10 mal je 50 μ l der äthanolischen ^3H -Cholesterin-
lösung in Meßgläschen pipettiert (= 100 % Wert). Die
Deckel der Meßgläschen wurden nur lose aufgeschraubt,
damit das Lösungsmittel verdunsten konnte.

Zu den Proben wurde 5,0 ml der alkoholischen
Kalilauge pipettiert und intensiv gemischt.

Anschließend wurden die Proben drei Stunden im
Wasserbad bei 37°C gehalten; während dieser Zeit
wurden die Proben alle 30 Minuten mit dem Mixomat
durchgeschüttelt.

Nach Zugabe von 1,0 ml n-Heptan und 4,0 ml Aqua dest. wurde jeweils heftig geschüttelt. Bei Cholesterinkonzentrationen von mehr als 300 mg% wurde die doppelte Menge n-Heptan, also 2,0 ml hinzugegeben.

Nach deutlicher Trennung der Flüssigkeitsphasen (einige Minuten) wurden mit einer Pasteur-Pipette von der oberen Phase ca. 0,5 ml in ein Spitzgläschen überführt.

Zur Bestimmung des freien Cholesterins wurde anstelle der 5,0 ml alkoholische KOH 5,0 ml Äthanol hinzugegeben, ansonsten wurde wie oben vorgegangen.

Bei der gaschromatographischen Analyse wurden gleichzeitig von jedem Extrakt drei mal 50 µl in ein Meßgläschen gegeben. Die Deckel der Meßgläschen wurden wiederum nur lose angeschraubt, damit das Lösungsmittel verdunsten konnte. War dies vollständig geschehen (nach 24 Stunden), wurden in jedes Meßgläschen (einschließlich der 10 Gläschen für den 100 %-Wert) 10 ml Szintillationsflüssigkeit gegeben und kräftig geschüttelt (Mixomat). Die Messung erfolgte im Szintillationsspektrometer.

Die Ergebnisse wurden als registrierte Zerfälle (counts) pro Minute ausgedrückt (=cpm). Aus den mittleren Ergebnissen der Proben ($\overline{\text{cpm}}_{\text{Pr}}$) und des 100%-Wertes ($\overline{\text{cpm}}_{100\%}$) wurde die Extraktionsrate nach der folgenden Formel berechnet:

$$\text{Extraktionsrate} = \frac{\overline{\text{cpm}}_{\text{Pr}} \cdot 20 \cdot 100}{\overline{\text{cpm}}_{100\%}} \quad (\%)$$

(in %)

b) Vorversuche, Ergebnisse und Diskussion

Das Verfahren zur Freisetzung des Cholesterins aus der Lipoproteinbindung und zur Spaltung der Cholesterinester wurde unverändert von DRISCOLL et al. (15) übernommen. Anstatt einer Stunde - wie von ABELL et al. (1) gefordert - wurde drei Stunden inkubiert und auf diese Weise, laut DRISCOLL et al. (15), eine Esterspaltung von praktisch 100 % erreicht.

Die Vollständigkeit der Hydrolyse bei der durchgeführten Methode wurde durch den im folgenden skizzierten Versuch bestätigt. Hierbei wurde wie oben beschrieben vorgegangen, nur wurde dem Serum anstelle des ^3H -Cholesterins $4\text{-}^{14}\text{C}$ -Cholesteryl oleat zugesetzt; die Hydrolyse wurde für

Tabelle 5: Zeitabhängigkeit der Hydrolyse von Cholesterinestern. Spaltung von $4\text{-}^{14}\text{C}$ -Cholesterinoleat mit äthanolischer KOH. Aktivität von ^{14}C -Cholesterin im Heptan-Extrakt nach Hydrolysedauer von 10, 20, 30, 60, 120 und 180 Min. (Dreifachbestimmungen)

Hydrolysedauer (Min.)	$4\text{-}^{14}\text{C}$ -Cholesterin (cpm)	cpm
10	9739	9387
	8575	
	9846	
20	15189	15084
	15314	
	14749	
30	16934	17331
	17072	
	17989	
60	21319	21783
	21851	
	22180	
120	22802	21989
	20870	
	22296	
180	22926	21959
	21647	
	21304	

jeweils drei Proben nach 10, 20, 30, 60, 120 und 180 Minuten abgebrochen. Die im Heptan befindlichen Substanzen wurden dünnschichtchromatographisch aufgetrennt. Die ^{14}C -Aktivität des auf diese Weise isolierten Cholesterins wurde im Packard-Szintillationsspektrometer gemessen. Die Ergebnisse sind in Tabelle 5 zusammengefaßt.

Wie aus den Ergebnissen der Tabelle 5 hervorgeht, ist die Hydrolyse von Cholesterinoleat bereits nach 60 Min. abgeschlossen. Es kann angenommen werden, daß dies für die übrigen Cholesterinester ebenfalls gilt. Um eine vollständige Spaltung der Cholesterinester zu gewährleisten, wurde bei den durchgeführten Versuchen eine Hydrolysedauer von 180 Min. eingehalten.

Die Zugabe von n-Heptan und Aqua dest. erfolgte wiederum wie von DRISCOLL et al. (15) angegeben, mit dem Unterschied, daß reines n-Heptan verwendet wurde und die 5,0 ml Aqua dest. dem Reaktionsgemisch nicht auf einmal, sondern in zwei Schritten zugefügt wurden (1ml vor und 1ml nach der Extraktion).

Bei der DRISCOLL-Methode kann nicht genau angegeben werden, in welchem Maße das im Serum befindliche Cholesterin in die Heptan-Phase übergeht, Untersuchungen mit "synthetischem Serum" (6 % Albuminlösung, der eine definierte Menge Cholesterin zugesetzt wird) ergaben eine Extraktionsrate von 99 % (15). ABELL et al. (1), die bei ihrem Verfahren die zehnfache Menge Lösungsmittel einsetzen, wiesen in Aufstockungsversuchen nach, daß die Extraktionsrate praktisch 100 % beträgt. Aus der sehr guten Übereinstimmung seiner Methode mit der ABELL-Methode schließt DRISCOLL, daß trotz des geringeren Lösungsmittelvolumens auch bei seiner Methode die Extraktion nahezu 100 % beträgt.

Bei dem zum Methodenvergleich durchgeführten Verfahren wurde - wie oben beschrieben - nach Zugabe von ^3H -Cholesterin für jedes Serum spezifisch die Extraktionsrate bestimmt.

Zu Beginn der Versuche stellte sich das Problem, das in äthanolischer Lösung befindliche ^3H -Cholesterin im Serum zu lösen. Eine direkte Zugabe schied aus, da es zu einer lokalen Eiweißausfällung kommt, bevor die Lösung gleichmäßig im Serum verteilt ist. Eine wäßrige Lösung kam wegen des stark lipophilen Charakters des Cholesterinmoleküls ebenfalls nicht in Frage.

Es erschien praktikabel, die äthanolische ^3H -Cholesterinlösung in ein Reagenzglas zu pipettieren, das Lösungsmittel abdampfen zu lassen, jetzt das Serum dazuzugeben und durch intensives Schütteln das ^3H -Cholesterin im Serum zu lösen. Nach dieser Methode wurden von zehn Seren in Dreifachbestimmungen die Cholesteringehalte ermittelt. Die Extraktionsraten lagen zwischen 50 % und 100 %, im Durchschnitt bei 70 % bis 80 %, also deutlich niedriger als erwartet. Auffällig war, daß bei der Dreifachbestimmung der meisten der zehn Seren die gaschromatographisch ermittelten Cholesterinkonzentrationen der Heptan-Extrakte dicht beieinander lagen, die Extraktionsraten jedoch sehr verschieden waren. Tabelle 6 zeigt die Ergebnisse bei der Dreifachbestimmung einer Serum-Probe.

Tabelle 6: Dreifachbestimmung einer Serum-Probe nach Zugabe von ^3H -Cholesterin in ungelöster Form

Unkorrigiertes Ergebnis der gaschromatographischen Bestimmung ($\text{mg}\%$)	Extraktionsrate in %	Mit der Extraktionsrate korrigiertes Ergebnis der gaschromatographischen Bestimmung ($\text{mg}\%$)
176,0	59,8	294,3
182,0	81,6	223,0
178,8	51,1	350,0

Die breite Streuung der Extraktionsraten bei Dreifachbestimmung eines Serums und die niedrigen Extraktionsraten standen im Gegensatz zu der von ABELL et al. (1) und DRISCOLL et al. (15) nachgewiesenen nahezu 100%igen Extraktion. Es wurde vermutet, daß das eingesetzte ^3H -Cholesterin nach Abdampfen des Lösungsmittels nur unzureichend vom Serum aufgenommen wird. Je nach Beschaffenheit des Reagenzglases muß also ein mehr oder weniger großer Anteil des ^3H -Cholesterins an der Wandung haften bleiben und auch nach intensivem Schütteln nicht vom Serum aufgenommen werden. Um diese Vermutung zu überprüfen, wurde der folgende Versuch mit einem Serum in Fünffachbestimmung durchgeführt:

- a) 100 μl der ^3H -Cholesterin-Lösung wurden in ein Spitzgläschen gegeben, das Lösungsmittel ließ man abdampfen. Nach Zugabe von 400 μl Serum wurde intensiv geschüttelt (Mixomat). Aus dem Spitzgläschen wurden 200 μl in ein Meßgläschen pipettiert, dazu kamen 10 ml Instagel ^{a)} als Szintillatorflüssigkeit.

a) Instagel (Packard Instruments, Nr. 6003059) ist eine Szintillationsflüssigkeit für wäßrige Proben

- b) 50 μ l ^3H -Cholesterin wurden in ein Meßgläschen gegeben, dazu 200 μ l Serum und wiederum 10 ml Instagel.

Die nach Messung im Packard Szintillations-spektrometer erhaltenen Werte sind in Tabelle 7 zusammengefaßt.

Tabelle 7: ^3H -Cholesterin im Serum nach Zugabe von ^3H -Cholesterin in ungelöster (a) und gelöster (b) Form

a) ungelöst			b) gelöst		
cpm/200µl	<u>cpm</u>	Abweichung von <u>cpm</u> in %	cpm/200µl	<u>cpm</u>	Abweichung von <u>cpm</u> in %
27013	31979	- 15,5	43130	43578	- 1,0
28644		- 10,4	43865		0,6
32054		0,2	43212		- 0,8
39159		22,4	44391		1,8
33024		3,3	43296		- 0,6
VK : 14,7 %			VK : 1,2 %		

Die gefundenen Werte zeigen, daß bei dem zunächst verwendeten Verfahren (Zugabe von Serum zu ^3H -Cholesterin nach Verdunstung des Lösungsmittels) nur ein Teil des eingesetzten ^3H -Cholesterins im Serum wiedergefunden wird. Bei einem Serum schwankt der Prozentsatz des Übertrittes von ^3H -Cholesterin in das Serum innerhalb weiter Grenzen (VK = 14,7 %). Zur Bestimmung der Extraktionsrate ist die angeführte Methode ungeeignet; die Verlustkorrektur des Ergebnisses der quantitativen Bestimmung ergibt folglich zusätzliche Fehler.

Als mögliche Fehlerquelle war noch eine Verschmutzung der Reagenzgläser mit radioaktiven Substanzen in Erwägung zu ziehen, obwohl dies bei dem im Labor üblichen Reinigungsverfahren unwahrscheinlich erschien (mehrstündiges Wässern; Einweichen und Spülen in Methanol- und Chloroform-Lösungen, schließlich Ausglühen). Die Sauberkeit wurde exemplarisch an 10 Spitzgläschen wie folgt nachgewiesen:

In jedes Spitzgläschen wurde 1 ml Heptan gegeben und intensiv geschüttelt. Hiervon wurden je 0,5 ml in Meßgläschen pipettiert. Die gefundenen Aktivitäten (Meßdauer 5 Min.) sind aus Tabelle 8 ersichtlich.

Tabelle 8: Radioaktive "Verschmutzung" von ordnungsgemäß gereinigten Spitzgläschen

Gläschen-Nr.	cpm
1	9,4
2	4,2
3	9,7
4	1,3
5	4,7
6	7,4
7	4,4
8	4,3
9	5,6
10	4,0

Die gemessenen Werte entsprachen dem "background" des Gerätes. Die verwendeten Spitzgläschen enthielten also praktisch keine radioaktiven Substanzen.

Eine zuverlässige, 100 %ige Einbringung des ^3H -Cholesterins in das Serum ist mit der folgenden Anordnung möglich, die bei der endgültigen Methode angewandt wurde:

- 0,5 ml Serum
- + 1,0 ml Aqua dest., gut mischen
- + 0,05ml ^3H -Cholesterin-Lösung, gut mischen.

Durch die Verdünnung mit Aqua dest. wird die Eiweißfällung durch die äthanolische ^3H -Cholesterin-Lösung vermieden.

Die Zuverlässigkeit der Methode wurde mit dem folgenden Versuch getestet (jeweils Zehnfachbestimmungen):

- a) direkt in ein Meßgläschen wurden pipettiert (nach jedem Schritt gut mischen):

- 0,2 ml Serum
- + 0,5 ml Aqua dest.
- + 0,1 ml äthanolische ^3H -Cholesterin-Lösung
- + 10,0 ml Instagel

- b) in ein Spitzgläschen wurden pipettiert (nach jedem Schritt gut mischen):

- 0,4 ml Serum
 - + 1,0 ml Aqua dest.
 - + 0,2 ml äthanolische ^3H -Cholesterin-Lösung
- davon wurden 0,8 ml in ein Meßgläschen gegeben
- + 10,0 ml Instagel

Die Ergebnisse der Messung im Packard-Szintillations-spektrometer sind in Tabelle 9 wiedergegeben.

Tabelle 9: Aufnahme von ^3H -Cholesterin im Serum bei Zugabe in gelöster Form
a) direkte Zusammengabe von ^3H -Cholesterin und Serum in einem Meßgläschen
b) Zusammengabe jeweils doppelter Mengen in einem Spitzgläschen; Überführung der Hälfte des Gemisches in ein Meßgläschen

a)

Nr.	cpm	<u>cpm</u>	Abweichung von cpm in %
1	91657	93969	- 2,4
2	94705		+ 0,8
3	93239		- 0,8
4	94686		+ 0,8
5	93446		- 0,5
6	92791		- 1,2
7	94358		+ 0,4
8	93719		- 0,3
9	96266		+ 2,4
10	94735		+ 0,8

VK = 1,3 %

b)

Nr.	cpm	<u>cpm</u>	Abweichung von cpm in %
1	93243	93953	- 0,7
2	95561		1,7
3	95703		1,8
4	94023		0,1
5	92372		- 1,7
6	95866		2,0
7	94775		0,8
8	92097		- 1,9
9	91956		- 2,1
10	93935		0,0

VK = 1,6 %

Die Abweichungen von cpm sind durch Pipettierfehler und die Meßungenauigkeit des Packard-Szintillationsspektrometers zu erklären. Der Quotient der Durchschnittswerte von b) und a) zeigt, daß sich das

zugegebene ^3H -Cholesterin vollständig im Serum wiederfindet:

$$\frac{\overline{\text{cpm}}_b}{\overline{\text{cpm}}_a} = \frac{93953}{93969} = 0,999$$

Dieses Verfahren wurde angewendet. Bei den im folgenden untersuchten Serumproben die durchschnittlichen Extraktionsraten $97,1 \pm 5,6$ (SD) % bei der Bestimmung des freien Cholesterins ($n=108$ (=36 Dreifachbestimmungen)) und $99,1 \pm 4,0$ (SD) % für Gesamtcholesterin ($n=156$ (=52 Dreifachbestimmungen)).

Bei der Dreifachbestimmung eines Serums differierten die Werte für die Extraktionsraten selten um mehr als 5 %. In fast allen Fällen variierten die unter Berücksichtigung der Extraktionsrate ermittelten Werte weniger als die entsprechenden unkorrigierten Werte. Die in Tabelle 10 wiedergegebene Dreifachbestimmung der Probe G 25 diene als Beispiel.

Tabelle 10: Ergebnisse der Dreifachbestimmung der Probe G 25

G = Gesamtcholesterin

25 = laufende Nummer der Probe

I, II, III = Nummer der Dreifachbestimmung

Nr. der Probe	Konzentration des Heptan-Extraktes (mg%)	Extraktionsrate	Serum-Cholesterinkonzentration (mg%)
G 25 I	167,4	96,9 %	172,7
G 25 II	169,0	98,0 %	172,4
G 25 III	168,9	98,5 %	171,5

In wenigen Fällen differierten bei der Dreifachbestimmung eines Serums die Extraktionsraten stärker; dann waren auch die unkorrigierten Werte entsprechend unterschiedlich, wie das in Tabelle 11 aufgetragene Beispiel zeigt.

Tabelle 11: Ergebnisse der Dreifachbestimmung der Probe G 13 (stark differierende Extraktionsraten)

Nr. der Probe	Konzentration des Heptan-Extraktes (mg%)	Extraktionsrate	Serum-Cholesterinkonzentration (mg%)
G 13 I	107,8	97,0 %	111,1
G 13 II	92,0	86,6 %	106,2
G 13 III	109,2	99,8 %	109,4

Durch die Zugabe von ^3H -Cholesterin ist es möglich, Pipettierfehler bei der Zugabe des Heptans zu korrigieren: Wird zuviel Heptan eingesetzt, so werden entsprechend niedrigere Extraktionsraten erhalten. Bei der Zugabe von zuwenig Heptan ergeben sich höhere Extraktionsraten, meist von über 100 %. Dies passiert auch dann, wenn in der Zeit zwischen Probenaufbereitung und gaschromatographischer Bestimmung ein Teil des Heptans verdunstet.

2. Gaschromatographische Bestimmung der Cholesterinkonzentration des Heptan-Extraktes

a) Angewandtes Verfahren

In den Gaschromatographen wurden jeweils ca. 3 μl der Cholesterinlösung injiziert. Es war schwierig, immer genau 3,0 μl aufzuziehen; die einmal aufgezoogene Menge

ließ sich aber genau ablesen. Die injizierten Volumina lagen zwischen 2,5 und 3,5 μ l, die erhaltenen "Peak"-Höhen wurden auf 1,0 μ l umgerechnet. In die Spritze wurde zunächst 1,0 μ l Heptan aufgezogen, anschließend 1,0 μ l Luft, dann die ca. 3 μ l Cholesterinlösung und zuletzt wieder Luft. Auf diese Weise war die aufgezogene Flüssigkeitssäule der Cholesterinlösung an beiden Enden von Luftsäulen deutlich begrenzt, so daß sich die aufgezogene Flüssigkeitsmenge genau ablesen ließ.

Nach jeder Injektion wurde die Hamilton-Spritze gereinigt, indem 5 - 10 mal hintereinander Aceton angesaugt und ausgespritzt wurde, anschließend Wiederholung des Vorganges mit Heptan. Die Spritzennadel wurde zur Reinigung über einen Zellstofftupfer gezogen.

Vor Beginn jeder gaschromatographischen Bestimmung mußte die Säule aufgesättigt werden; dies geschah durch mindestens zehnmalige Injektion einer 150 mg-%-Cholesterin-Lösung. Spätestens nach 50 Injektionen mußte das Septum am Injektor gewechselt werden.

Das Vorgehen bei der gaschromatographischen Bestimmung sei exemplarisch an der bereits oben als Beispiel erwähnten Probe G 25 erläutert:

Von der Probe liegen drei Heptan-Extrakte vor, I, II und III. Die erste Injektion einer Probe wird durch den Zusatz "a" gekennzeichnet, die zweite durch "b", die dritte durch "c".

Zunächst wurde durch eine orientierende Injektion der Cholesteringehalt des Heptan-Extraktes grob geschätzt (Vergleich der "Peak"-Höhe mit der einer Standard-Lösung). Hiernach richtete sich die Auswahl

der zu verwendenden Standard-Lösungen. Für die Probe G 25 zeigte die orientierende Injektion, daß die Konzentration des Heptan-Extraktes zwischen St 150 und St 200 liegen mußte. Als Standard-Lösungen wurden verwendet: St 150, St 200, St 250.

Injiziert wurde nun in der folgenden Reihenfolge:

St 150
G 25 I a
St 200
G 25 II a
St 250
G 25 III a
St 150
G 25 I b
St 200
G 25 II b
... nach diesem Schema weiter bis ...
G 25 II c
St 250
G 25 III c

Unter Verwendung eines Tischrechners HP 9820 A (Hewlett Packard) wurde aus den Meßwerten und den entsprechenden Konzentrationen die Eichgerade nach der Methode der kleinsten Fehlerquadrate berechnet. Die Werte für das obige Beispiel sind in Tabelle 12 wiedergegeben.

Tabelle 12: Ermittlung der Eichgeraden für die Probe G 25

c	Injizierte Menge (µl)	PH (mm)	PH bezogen auf 1,0 µl (mm)
St 150	2,9	77,5	26,7
	2,95	77,5	26,3
	2,9	77,5	26,7
St 200	2,85	107,0	37,5
	3,0	115,5	38,5
	2,95	112,0	38,0
St 250	3,2	158,0	49,4
	2,8	138,0	49,3
	3,0	148,0	49,3

Korrelationskoeffizient der Eichgeraden : 0,9996

Geradengleichung: $c = 4,38 \text{ PH} + 33,4$

Von den für jeden Heptan-Extrakt gefundenen drei "Peak"-Höhen (a,b,c, jeweils auf 1,0 μ l umgerechnet) wurde der Mittelwert gebildet und (als x-Wert) in den Rechner eingegeben. Der ermittelte y-Wert gibt die Cholesterinkonzentration des Extraktes an (s.Tabelle 13).

Tabelle 13: Ermittlung der Cholesterinkonzentration des Heptan-Extraktes für die Probe G 25

Proben Nr.	Injizierte Menge (μ l)	PH (mm)	PH bezogen auf 1,0 μ l (mm)	$\overline{\text{PH}}$ (mm)
G 25 I a	2,9	89,0	30,7	30,57
b	2,9	90,5	31,2	
c	2,7	80,5	29,8	
G 25 II a	2,9	89,5	30,8	30,90
b	3,1	96,5	31,1	
c	2,95	91,0	30,8	
G 25 III a	3,0	92,0	30,7	30,87
b	3,05	93,5	30,6	
c	3,1	97,0	31,3	

Konzentrationen des Heptan-Extraktes:

G 25 I	:	167,4 mg%
G 25 II	:	169,0 mg%
G 25 III	:	168,9 mg%

b) Vorversuche, Ergebnisse und Diskussion

Im Gegensatz zur DRISCOLL-Methode wurde bei dem beschriebenen Verfahren ohne internen Standard gearbeitet. Dies hatte mehrere Gründe.

Nach DRISCOLL et al. (15) wird der interne Standard dem als Extraktionsmittel dienenden Heptan bereits vor der Extraktion zugesetzt, d.h. der interne Standard kommt während der Extraktion mit dem alkalisch-wässrigen Milieu der Probenlösung in Kontakt. Obwohl

es wenig wahrscheinlich ist, daß der interne Standard (Octacosan) durch die alkalisch-wäßrige Lösung irgendwie verändert wird oder aus der Heptan-Phase in die wäßrige Phase übertritt, ist die Zugabe des internen Standards zum Extraktionsmittel vor der Extraktion nicht korrekt.

Hingegen ist es möglich, nach der Extraktion Heptan-Extrakt und internen Standard zusammen zu bringen, z.B.

0,5 ml Heptan-Extrakt
+ 0,5 ml Heptan-Lösung des internen Standards

Hierdurch sind gegenüber dem durchgeführten Verfahren zwei Pipettierschritte mehr erforderlich. Jede Pipettierung bedeutet eine zusätzliche Fehlermöglichkeit. Der Pipettierfehler bei der Eppendorf-Pipette für 500 μ l wird vom Hersteller mit 2 % für organische Lösungen angegeben.

Das von DRISCOLL et al. (15) als interner Standard benutzte Octacosan war zu Versuchsbeginn in Deutschland nicht erhältlich; nach Auskunft der Lieferfirma hätte eine Beschaffung aus den USA ca. drei Monate gedauert. Deshalb wurde - weil im Laboratorium vorhanden - Cholestenon (Cholest-4-en-3-on) auf seine Eignung als interner Standard untersucht. Hierzu wurden je eine Spatelspitze Cholestenon und Cholesterin in 10 ml Heptan gelöst. Die gaschromatographische Analyse ergab, wie aus Abbildung 5 (s.S.36) ersichtlich, zwei deutlich getrennte "Peaks", Retentionszeit für Cholesterin 4,0 Min., für Cholestenon 5,5 Min.

Von dem Cholesterin-Cholestenon-Gemisch wurden 10 mal jeweils ca. 4 µl in den Gaschromatographen injiziert. Folgende Ergebnisse wurden erhalten (Tab. 13):

Tabelle 13: Ergebnisse bei Injektion eines Gemisches aus Cholesterin und Cholestenon
PH = "Peak"-Höhe
PHR = "peak height ratio"
(Verhältnis der "Peak"-Höhen)

Nr.	Injizierte Menge (µl)	PH Cholesterin (mm)	PH Cholestenon (mm)	PHR	Abweichung von PHR in %
1	4,0	79,0	74,0	1,067	+ 1,1
2	4,0	77,0	71,0	1,084	+ 2,7
3	4,1	81,0	75,5	1,072	+ 1,5
4	4,1	80,0	73,5	1,088	+ 3,1
5	4,0	76,5	72,5	1,055	0,0
6	4,3	85,0	82,0	1,036	- 1,9
7	4,3	87,5	86,0	1,017	- 3,7
8	4,1	79,5	76,0	1,046	- 0,9
9	3,9	77,0	73,0	1,054	- 0,2
10	4,05	81,0	78,0	1,038	- 1,7

Mittelwert der PHR ($\overline{\text{PHR}}$) = 1,0557

Variationskoeffizient der PHR : 2,1 %

Werden in dem eben beschriebenen Versuch nur die Cholesterin-"Peaks" berücksichtigt und auf 1,0 µl umgerechnet, so ergibt sich (Tabelle 14):

Tabelle 14: PH für Cholesterin, bezogen auf 1,0 µl injizierte Menge

Nr.	Injizierte Menge (µl)	PH (mm)	PH bezogen auf 1,0 µl (mm)	Abweichung von PH in %
1	4,0	79,0	19,7	+ 0,2
2	4,0	77,0	19,3	- 1,7
3	4,1	81,0	19,7	+ 0,2
4	4,1	80,0	19,5	- 0,7
5	4,0	76,5	19,1	- 2,8
6	4,3	85,0	19,8	+ 0,7
7	4,3	87,5	20,3	+ 3,3
8	4,1	79,5	19,4	- 1,3
9	3,9	77,0	19,7	+ 0,2
10	4,05	81,0	20,0	+ 1,7

Mittelwert der PH ($\overline{\text{PH}}$) = 19,65 mm

VK der PH = 1,7 %

Aus den Tabellen 13 und 14 geht hervor:

- Bei mehrmaliger Injektion eines Cholesterin-Cholestenon-Gemisches streuen die ermittelten "peak height ratios" mit 2,1 % um den Mittelwert
- Werden nur die durch die injizierten Mengen dividierten "Peak"-Höhen der Cholesterin-"Peaks" verglichen, so streuen diese 1,7 % um den Mittelwert. Mit mehr Übung in der Ablese- und Injektionstechnik ließ sich hier die Präzision noch verbessern

Die Verwendung von Cholestenon als interner Standard bringt gegenüber der einfachen Injektion keine Verbesserung der Präzision. Die Durchführung der Bestimmung mit internem Standard in der oben vorgeschlagenen Weise erfordert zwei zusätzliche Pipettierschritte; insgesamt ist also mit einer geringeren Präzision als bei der benutzten Methode zu rechnen.

Für die benutzten Standard-Lösungen galt es, die direkte Proportionalität zwischen injizierter Cholesterin-Menge und "Peak"-Höhe nachzuweisen. Die Ergebnisse sind in den Tabellen 15 und 16 zusammengefaßt.

Tabelle 15: Nachweis der direkten Proportionalität zwischen injizierter Cholesterin-Menge und "Peak"-Höhe im Konzentrationsbereich 25 - 150 mg% (St 50 - St 300)

Probe	Injizierte Menge (µl)	PH (mm)	PH bezogen auf 1,0 µl (mm)	PH (mm)
150 mg% (St 300)	4,05	145,0	35,80	34,91
	4,0	142,5	35,62	
	4,1	140,5	34,27	
	4,1	140,5	34,27	
	4,05	140,5	34,69	
	4,15	145,0	34,94	
	4,1	142,0	34,63	
	3,95	137,5	34,81	
	4,0	139,5	34,87	
	3,9	137,5	35,25	

Tabelle 15 (Fortsetzung)

Probe	Injizierte Menge (μ l)	PH (mm)	PH bezogen auf 1,0 μ l (mm)	$\overline{\text{PH}}$ (mm)
<u>125 mg%</u>	4,0	115,0	28,75	28,97
(St 250)	4,0	114,5	28,62	
	3,95	114,0	28,86	
	4,0	115,0	28,75	
	4,05	118,5	29,25	
	3,9	112,0	28,71	
	3,95	115,5	29,24	
	4,05	118,0	29,13	
	4,05	118,5	29,25	
	4,1	119,5	29,14	
<u>100 mg%</u>				22,85
(St 200)	4,0	89,0	22,25	
	3,95	87,0	22,02	
	3,95	93,0	23,54	
	4,15	97,5	23,49	
	4,05	93,5	23,08	
	4,0	90,5	22,62	
	4,05	93,0	22,96	
	3,9	90,5	23,20	
	4,05	91,0	22,46	
	4,2	96,5	22,97	
<u>75 mg%</u>				16,53
(St 150)	4,0	67,5	16,87	
	3,85	64,0	16,62	
	4,15	69,0	16,62	
	4,05	67,0	16,54	
	4,05	65,0	16,05	
	4,05	68,5	16,91	
	4,1	68,0	16,58	
	4,0	64,5	16,12	
	4,0	67,0	16,75	
	4,0	65,0	16,25	
<u>50 mg%</u>				10,53
(St 100)	4,15	44,0	10,60	
	4,0	41,0	10,25	
	3,95	41,0	10,38	
	4,15	44,5	10,72	
	4,3	46,0	10,70	
	4,1	42,0	10,24	
	4,5	48,5	10,77	
	4,05	42,5	10,49	
	4,05	42,0	10,37	
	4,3	46,5	10,81	

Tabelle 15 (Fortsetzung)

Probe	Injizierte Menge (µl)	PH (mm)	PH bezogen auf 1,0 µl (mm)	$\overline{PH}$ (mm)
<u>25 mg%</u>				
(St 50)	4,05	18,5	4,57	4,40
	4,1	18,5	4,51	
	4,6	20,5	4,45	
	4,1	17,5	4,27	
	4,0	17,5	4,37	
	3,9	16,9	4,33	
	4,0	18,0	4,50	
	4,1	18,0	4,39	
	4,1	18,0	4,39	
	3,9	16,5	4,23	

Korrelationskoeffizient der Regressionsgeraden : 0,999

Geradengleichung: $PH = 0,245 C - 1,7$

Der für die Regressionsgerade gefundene Korrelationskoeffizient von 0,999 beweist die direkte Proportionalität zwischen injizierter Cholesterinmenge und "Peak"-Höhe. Das-selbe gilt für den Konzentrationsbereich von 12,5 - 37,5 mg% (St 25 - St 75) mit einem Korrelationskoeffizienten von 0,999 (Tab. 16).

Tabelle 16: Nachweis der direkten Proportionalität zwischen injizierter Cholesterin-Menge und "Peak"-Höhe im Konzentrationsbereich von 12,5 - 37,5 mg% (St 25 - St 75)

Probe	Injizierte Menge (µl)	PH (mm)	PH bezogen auf 1,0 µl (mm)	$\overline{PH}$ (mm)
<u>12,5 mg%</u>				
(St 25)	3,9	29,5	7,56	7,51
	3,9	29,5	7,56	
	3,8	28,5	7,50	
	4,0	30,0	7,50	
	3,9	29,0	7,44	
	3,8	28,5	7,50	

Tabelle 16 (Fortsetzung)

Probe	Injizierte Menge (μl)	PH (mm)	PH bezogen auf 1,0 μl (mm)	$\overline{\text{PH}}$ (mm)
<u>25 mg%</u>				
(St 50)	3,9	62,0	15,90	15,97
	4,05	65,0	16,05	
	4,05	65,0	16,05	
	4,05	64,0	15,80	
	4,0	64,5	16,12	
	3,9	62,0	15,10	
<u>37,5 mg%</u>				
(St 75)	3,9	99,0	25,38	25,27
	4,0	101,5	25,37	
	4,2	106,5	25,36	
	4,0	98,5	24,63	
	4,3	110,0	25,58	
	3,95	100,0	25,32	

Korrelationskoeffizient der Regressionsgeraden: 0,999

Geradengleichung: $\text{PH} = 0,710 \text{ C} - 1,5$

Mit diesen Versuchen wurde nachgewiesen, daß für Cholesterin innerhalb des Konzentrationsbereiches von 12,5 - 150 mg% (St 25 - St 300) "Peak"-Höhe und Cholesterinkonzentration direkt proportional sind. Die Proportionalität gilt auch für höhere Konzentrationen; dies nachzuweisen war nicht erforderlich, da bei Seren mit Cholesterinkonzentrationen von mehr als 300 mg% die doppelte Menge Extraktionsmittel (also 2,0 ml Heptan) zugesetzt wurde, die Konzentration des Heptan-Extraktes also wieder im Bereich von 12,5 - 150 mg% lag.

Die Standard-Lösungen wurden in Glaskolben mit Schliffstopfen im Kühlschrank aufbewahrt. Vor jeder Bestimmungsserie wurden von den benötigten Standard-Lösungen jeweils etwa 3 - 5 ml in ein Spitzgläschen gegeben. Die Stopfen der Spitzgläschen wurden jeweils

nur kurz zur Entnahme von Lösung entfernt, um die Verdunstung von Heptan und damit Verfälschung des Standards möglichst gering zu halten. Um einen Überblick über das Ausmaß der Verdunstung von Heptan zu bekommen, wurde folgender Versuch gemacht: In ein Spitzgläschen wurden 5 g Heptan gegeben (etwa $\frac{3}{4}$ voll); das Spitzgläschen wurde bei Zimmertemperatur offen stehen gelassen und der Verdunstungsverlust in regelmäßigen Abständen durch Wiegen bestimmt. Die Resultate zeigt Tabelle 17.

Tabelle 17: Verdunstung von Heptan;
Ausgangsgewicht = 5 g

Verdunstungsdauer (Min.)	Gewichtsverlust (g)	Gewichtsverlust in % des Ausgangsgewichtes
30	0,02	0,4
60	0,04	0,8
120	0,09	1,8
180	0,12	2,4

Der durch Verdunstung entstehende Verlust beträgt pro Stunde also weniger als 1 %. Da die Stopfen der Spitzgläschen jeweils nur wenige Sekunden zur Probenentnahme entfernt wurden, war die während einer Bestimmungsserie auftretende Veränderung der Standard-Lösungen durch Verdunstung des Lösungsmittels vernachlässigbar klein.

V. ERGEBNISSE DES METHODENVERGLEICHES

=====

A. Präzision

Zur Überprüfung der Präzision wurde Serum einer Blutkonserve verwendet (s.S. 45)

1. Freies Cholesterin

Die bei der Untersuchung der Präzision in der Serie gefundenen Ergebnisse sind in Tabelle 18 wiedergegeben. Es zeigt sich, daß die Streuung für GC (VK = 1,76 %) wesentlich geringer ist als für E (VK = 5,79 %).

Tabelle 18: Präzision in der Serie für die Bestimmung des freien Cholesterins; n = 10

Methode	GC	E
Konzentration (mg%)	39,9	38,0
	39,9	39,3
	40,0	43,3
	40,6	43,3
	40,7	43,3
	40,8	44,5
	41,0	44,5
	41,3	44,5
	41,4	44,5
	42,1	45,9
Mittelwert (mg%)	40,8	43,1
SD (mg%)	0,72	2,50
VK (%)	1,76	5,79

Bei der Untersuchung der Präzision von Tag zu Tag wurden von dem Präzisionsserum an acht verschiedenen Tagen Dreifachbestimmungen durchgeführt. Die Ergebnisse

sind in Tabelle 19 zusammengefaßt. Werden die Mittelwerte der Dreifachbestimmungen zugrunde gelegt, so weisen beide Methoden fast die gleiche Schwankung auf; für GC beträgt VK = 4,28 %, für E VK = 4,20 %.

Tabelle 19: Präzision von Tag zu Tag für die Bestimmung des freien Cholesterins; n=8 (Dreifachbestimmungen)

Methode	GC	Mittelwert der Dreifachbestimmung	E	Mittelwert der Dreifachbestimmung
Konzentration (mg%)	41,4	41,7	52,0	52,7 *)
	42,3		51,0	
	41,6		55,0	
	43,3	43,0	43,0	43,0
	43,2		44,0	
	42,5		42,0	
	39,2	38,8	43,3	42,4
	38,6		41,9	
	38,1		41,9	
	38,8	38,7	41,9	43,3
	39,2		44,6	
	38,1		43,3	
	40,3	40,8	43,3	44,2
	41,4		43,3	
	40,7		45,9	
	39,8	40,2	44,5	46,3
	40,4		48,5	
	40,3		45,9	
	44,6	43,5	40,6	41,9
	42,4		43,3	
	43,4		41,9	
	41,6	41,3	39,3	40,6
	41,2		40,6	
	41,0		41,9	
Mittelwert (mg%)		41,0*	43,1	
SD (mg%)		1,75	1,81	
VK (%)		4,28	4,20	

*) Dieser Wert wurde nicht berücksichtigt

2. Gesamtcholesterin

Bei der Bestimmung des Gesamtcholesterins war die Präzision in der Serie für GC (VK = 1,95 %) besser als für E (VK = 3,18 %). Bei E wiederum streuten die Werte weniger als bei LB (VK = 4,57 %). Die Ergebnisse der Untersuchung der Präzision in der Serie sind in Tabelle 20 wiedergegeben.

Tabelle 20: Präzision in der Serie für die Bestimmung des Gesamtcholesterins; n = 10

Methode	GC	E	LB *)
Konzentration (mg%)	157,5	157,3	160
	158,5	161,3	161
	160,9	162,6	164
	161,7	163,9	168
	162,2	163,9	173
	162,7	163,9	173
	164,6	165,2	175
	165,7	169,1	178
	166,2	173,0	178
	166,8	174,4	178
			178
			178
			181
			181
			184
			184
			184
			185
			186
			186
Mittelwert (mg%)	162,7	165,4	176,7
SD (mg%)	3,17	5,26	8,08
VK (%)	1,95	3,18	4,57

*) LB bestimmt automatisch jede Probe doppelt, d.h. pro Probe liegen zwei Werte vor.

Die Ergebnisse für die Präzision von Tag zu Tag fielen für alle drei Methoden schlechter aus als die entsprechenden Werte der Präzision in der Serie. Wie aus Tabelle 21 zu ersehen ist, streuten die Einzelwerte bei GC wiederum am wenigsten (VK = 3,51 %); bei E (VK = 5,29 %) war der Variationskoeffizient geringfügig besser als bei LB (VK = 5,87 %).

Tabelle 21: Präzision von Tag zu Tag für die Bestimmung des Gesamtcholesterins; n = 10

GC	Mittelwert der Drei- fachbest.	E	Mittelwert der Drei- fachbest.	LB	Mittelwert der Drei- fachbest.
172,5	172,3	153	152,0	188/185	186,2
172,6		150		194/180	
171,8		153		183/187	
157,8	157,1	176	176,3	177/164	168,7
156,5		175		170/170	
157,0		178		170/161	
161,1	158,3	162,6	163,9	165/166	164,5
158,6		174,4		163/158	
155,3		154,7		167/168	
162,4	159,5	165,2	171,8	162/161	162,5
156,4		175,7		163/159	
159,6		174,4		166/170	
163,0	163,0	165,2	162,6	186/188	186,8
161,6		158,6		190/181	
164,4		163,9		188/188	
164,4	167,5	156,0	160,8	189/181	171,3
167,4		167,8		174/156	
170,7		158,6		174/164	
158,0	155,0	154,7	160,8	197/197	183,7
152,1		165,2		184/194	
154,9		162,6		197/193	
163,8	165,6	163,9	163,9	182/188	179,7
167,8		162,5		179/176	
165,1		165,2		176/177	
157,6	196,6	145,5	147,2	175/180	181,0
181,1		148,1		178/189	
170,0		148,1		186/178	
163,7	165,7	173,0	168,7	162/165	172,7
167,0		163,9		174/176	
166,4		169,1		178/181	
Mittelwert					
(mg%)	163,36		162,80		167,71
SD (mg%)	5,74		8,62		10,37
VK (%)	3,51		5,29		5,87

B. Vergleich der Methoden

Bei dem Vergleich von zwei Methoden werden üblicherweise die entsprechenden Wertepaare in ein Koordinatensystem eingetragen und für sie die Regressionsgerade und der Korrelationskoeffizient berechnet. Ist der Ordinatenabschnitt der Regressionsgeraden signifikant von 0 verschieden und/oder ist das Steigungsmaß signifikant von 1 verschieden, so läßt dies darauf schließen, daß die Spezifität der verglichenen Methode geringer ist als die der Referenzmethode. Beträgt der Korrelationskoeffizient (r-Wert) mindestens 0,95, so besteht eine gute lineare Abhängigkeit zwischen beiden Methoden. Liegen die r-Werte zwischen 0,80 und 0,95, so können sie sowohl aus einer guten, aber nicht linearen Beziehung resultieren wie aus einer linearen Beziehung bei großer Streuung der Meßwerte um die Regressionsgerade (54).

1. Freies Cholesterin

In Tabelle 22 sind die Ergebnisse der Bestimmung des freien Cholesterins nach GC und E aufgeführt. Die graphische Darstellung der entsprechenden Wertepaare in einem Koordinatensystem zeigt Abbildung 7.

Die mit beiden Methoden gefundenen Werte stimmen gut überein; die lineare Abhängigkeit zwischen GC und E drückt sich in der Gleichung der Regressionsgeraden $E = 1,095 \text{ GC} - 4,91$ aus. Für das Streuungsmaß ergab sich ein Korrelationskoeffizient von 0,99 bei 36 untersuchten Fällen. Damit besteht eine sehr gute Korrelation zwischen der Referenzmethode GC und der zu vergleichenden Methode.

Tabelle 22: Bestimmung des freien Cholesterins nach GC und E (geordnet nach steigenden Konzentrationen der GC-Werte)

GC	Mittelwert der Dreifachbest.	E	Mittelwert der Dreifachbest.
(mg%)			(mg%)
24,9		23,6	
24,7	24,7	26,2	24,0
24,6		22,3	
28,2		31,5	
28,0	28,2	30,2	31,9
28,4		34,1	
28,0		27,5	
28,2	28,2	24,9	25,8
28,4		24,9	
30,9		28,8	
31,2	31,2	26,2	26,6
31,6		24,9	
33,7		32,8	
33,8	33,7	31,5	33,2
33,7		35,4	
34,9		33,0	
35,6	35,4	34,0	33,3
35,7		33,0	
36,6		30,0	
36,4	36,5	34,0	31,7
36,4		31,0	
39,2		36,0	
39,7	39,5	33,0	35,0
39,5		36,0	
39,9		38,0	
39,9	39,9	39,3	40,2
40,0		43,3	
42,4		39,0	
40,1	41,3	41,0	39,7
41,4		39,0	
43,3		43,0	
43,2	43,0	44,0	43,0
42,5		42,0	
44,6		40,6	
42,4	43,5	43,3	41,9
43,4		41,9	
48,3		50,0	
49,0	48,8	51,0	49,7
49,0		48,0	

Tabelle 22 (Fortsetzung)

GC	Mittelwert der Dreifachbest.	E	Mittelwert der Dreifachbest.
(mg%)		(mg%)	
49,9		48,0	
48,9	49,2	48,0	47,3
48,9		46,0	
51,8		47,2	
54,5	52,8	41,9	45,9
52,0		48,5	
54,6		55,1	
53,6	54,0	51,1	54,2
53,8		56,4	
56,1		55,0	
55,6	55,9	55,0	54,7
56,1		54,0	
57,5		62,9	
58,1	57,9	70,8	67,7
58,0		69,5	
63,9		62,9	
57,5	59,5	61,6	64,2
57,0		68,2	
61,0		58,0	
62,2	61,3	58,0	59,0
60,9		61,0	
64,2		67,0	
63,1	64,4	73,0	70,3
65,9		71,0	
65,5		61,0	
67,1	66,1	61,0	60,7
65,8		60,0	
66,6		64,2	
66,5	66,6	69,5	66,4
66,7		65,5	
69,8		69,0	
68,1	68,7	73,0	71,0
68,1		71,0	
74,7		72,0	
69,5	71,4	76,0	73,0
71,0		71,0	
73,7		77,3	
72,7	73,1	76,0	77,3
73,0		78,6	

Tabelle 22 (Fortsetzung)

GC	Mittelwert der Dreifachbest.	E	Mittelwert der Dreifachbest.
(mg%)		(mg%)	
74,5	74,7	86,0	84,7
74,6		82,0	
75,0		86,0	
83,3	81,1	69,5	72,1
79,2		70,8	
80,8		76,0	
83,6	84,3	82,6	85,6
84,8		86,5	
84,4		87,8	
92,5	92,9	97,0	100,9
92,8		103,6	
93,3		102,2	
103,6	102,7	103,0	105,7
102,4		107,0	
102,1		107,0	
108,7	107,7	108,0	105,3
105,6		103,0	
108,7		105,0	
114,7	116,9	135,0	134,2
114,6		133,7	
121,5		133,7	
121,4	121,8	137,6	136,3
121,0		135,0	
123,0		136,3	
138,3	137,0	144,0	142,3
136,9		141,0	
135,8		142,0	
141,4	141,4	148,1	145,1
140,9		140,3	
141,9		146,8	

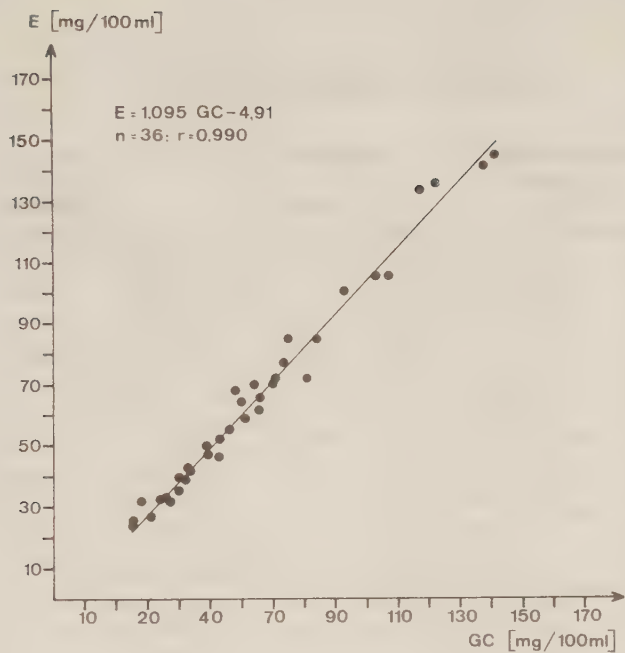


Abbildung 7: Korrelation zwischen der Bestimmung
des freien Cholesterins nach GC und E
($s_{xy} = 4,89$)

2. Gesamtcholesterin

Die bei der Bestimmung des Gesamtcholesterins nach GC, E und LB gefundenen Werte sind in Tabelle 23 wiedergegeben. Im folgenden werden jeweils zwei der drei Methoden miteinander verglichen.

Tabelle 23: Bestimmung des Gesamtcholesterins nach GC, E und LB (geordnet nach steigenden Konzentrationen der GC-Werte)

GC	Mittelwert der Drei- fachbest.	E	Mittelwert der Drei- fachbest.	LB	Mittelwert der Drei- fachbest.
(mg%)		(mg%)		(mg%)	
67,3		76,0		94/72	
70,7	69,2	70,8	72,1	86/86	87,1
69,5		69,5		94/91	
76,3		72,0		104/104	
78,3	76,3	74,0	72,3	108/107	105,7
74,2		71,0		105/106	
89,6		89,1		108/106	
89,1	89,3	91,8	90,4	114/112	110,5
89,3		90,4		113/110	
100,1		98,3		120/118	
100,7	99,9	99,6	99,6	111/112	115,5
98,8		100,9		116/116	
99,3		93,0		128/122	
100,4	100,2	92,0	91,3	113/122	121,3
100,9		89,0		123/120	
111,1		103,0		128/134	
106,2	108,9	105,0	103,3	126/127	127,5
109,4		102,0		127/123	
120,4		128,0		140/133	
102,7	111,0	131,0	128,3	144/158	139,3
109,9		126,0		141/140	
116,0		120,6		130/128	
115,9	116,6	124,5	121,0	125/124	123,7
117,8		117,9		116/119	
117,6		108,0		183/185	
118,1	117,6	106,0	107,7	187/181	183,5
117,0		109,0		179/186	
138,6		150,8		165/174	
140,0	139,0	152,1	150,8	162/167	166,3
138,5		149,4		165/165	

Tabelle 23 (Fortsetzung)

GC	Mittelwert der Drei- fachbest.	E	Mittelwert der Drei- fachbest.	LB	Mittelwert der Drei- fachbest.
(mg%)			(mg%)		(mg%)
139,8		136,3		166/163	
140,2	141,1	131,1	133,7	166/166	165,2
143,2		133,7		166/164	
138,0		157,0		158/161	
137,0	142,1	159,0	157,0	186/182	176,3
151,3		155,0		188/183	
152,3		140,0		162/161	
147,4	147,9	141,0	140,0	160/159	160,2
144,0		139,0		158/161	
151,8		161,2		159/162	
153,3	152,6	170,4	165,6	164/173	162,8
152,7		165,2		181/180	
164,8		170,0		188/187	
145,5	156,4	169,0	169,7	186/184	187,0
154,0		170,0		188/187	
161,1		162,6		165/166	
158,6	158,3	174,4	163,9	163/158	164,5
155,3		154,7		167/168	
169,6		162,0		186/188	
159,9	161,6	163,0	163,3	184/185	185,5
155,2		165,0		185/185	
167,3		184,8		204/207	
165,7	163,2	178,3	181,3	204/207	205,5
156,6		180,9		205/206	
167,0		161,2		185/173	
164,8	164,8	174,4	167,4	185/168	177,7
162,6		166,5		168/169	
163,8		163,9		182/188	
167,8	165,6	162,5	163,9	175/176	179,7
165,1		165,2		176/177	
167,8		160,0		176/165	
164,8	168,0	157,0	158,0	180/164	170,8
171,3		157,0		165/175	
147,6		145,5		175/180	
181,1	169,6	148,1	147,2	178/189	181,0
180,0		148,1		186/178	
168,0		237,3		232/231	
174,3	170,4	226,8	226,8	229/229	230,3
169,0		216,3		230/231	

Tabelle 23 (Fortsetzung)

GC	Mittelwert der Drei- fachbest.	E	Mittelwert der Drei- fachbest.	LB	Mittelwert der Drei- fachbest.
(mg%)			(mg%)		(mg%)
168,4		215,0		220/211	
171,3	171,2	205,8	213,7	221/207	217,8
174,0		220,2		226/222	
183,4		188,8		188/180	
181,4	181,9	191,4	192,3	185/184	195,5
181,0		196,6		226/210	
183,6		234,0		251/243	
185,3	184,5	235,0	234,7	252/250	249,7
184,6		235,0		251/249	
190,2		181,6		230/224	
185,1	186,7	179,6	181,6	225/225	225,3
184,9		183,5		224/224	
189,8		199,3		289/283	
191,0	192,7	220,2	211,1	286/284	286,7
197,2		213,7		288/288	
211,5		181,0		230/214	
212,7	212,3	185,0	182,3	218/220	218,5
212,7		181,0		214/215	
215,2		301,5		286/278	
216,7	215,8	304,1	303,2	281/284	285,2
215,6		304,1		288/294	
220,8		242,5		241/242	
222,2	221,5	249,1	242,5	244/251	245,6
221,6		236,0		250/246	
220,9		220,0		226/226	
223,9	223,3	222,0	219,7	232/228	227,8
225,1		217,0		231/224	
222,2		343,5		326/328	
227,8	226,1	331,6	339,1	330/331	328,5
228,2		342,2		329/327	
229,4		217,0		250/250	
230,1	230,1	213,0	216,0	253/245	248,7
230,7		218,0		241/253	
228,3		229,0		252/254	
234,5	233,5	227,0	229,0	259/255	259,0
237,8		231,0		284/250	

Tabelle 23 (Fortsetzung)

GC	Mittelwert der Drei- fachbest. (mg%)	E	Mittelwert der Drei- fachbest. (mg%)	LB	Mittelwert der Drei- fachbest. (mg%)
232,9		368,4		418/379	
234,8	234,3	380,2	372,8	468/468	439,8
235,2		369,7		456/450	
231,2		258,3		262/259	
239,5	234,6	262,2	263,5	260/265	262,2
233,1		270,1		261/266	
246,4		306,8		323/323	
243,5	241,2	314,6	311,1	323/324	323,7
233,6		312,0		326/323	
252,1		323,8		306/302	
246,7	247,0	340,8	332,1	314/303	306,3
242,2		331,7		308/305	
255,8		279,2		251/260	
242,2	248,5	259,6	272,2	268/268	262,8
247,6		277,9		266/264	
259,6		238,0		238/229	
248,2	255,7	241,0	240,0	245/246	240,7
252,2		241,0		248/244	
258,4		254,0		304/316	
257,9	256,7	251,0	253,3	306/314	312,8
253,9		255,0		323/314	
262,3		395,9		374/391	
267,6	266,1	416,9	407,3	371/371	380,5
268,4		409,0		388/388	
282,0		364,4		361/371	
278,2	279,8	369,7	365,2	373/371	374,0
279,1		361,8		392/376	
300,5		336,9		316/309	
303,0	304,1	354,0	347,8	310/314	313,8
308,8		352,6		318/316	
312,4		371,0		347/357	
311,0	312,2	386,7	381,0	353/354	354,2
313,2		385,4		353/361	
326,9		399,8		373/377	
340,2	330,5	395,9	398,9	377/377	377,5
324,3		401,2		379/382	
334,7		346,1		411/414	
335,9	331,7	356,6	353,9	411/413	413,2
324,4		359,2		412/418	

Tabelle 23 (Fortsetzung)

GC	Mittelwert der Drei- fachbest.	E	Mittelwert der Drei- fachbest.	LB	Mittelwert der Drei- fachbest.
(mg%)			(mg%)	(mg%)	
352,0		409,0		406/398	
348,0	350,4	405,1	409,4	395/401	400,1
351,2		414,3		398/405	
429,3		411,7		503/486	
415,2	423,4	424,8	421,2	484/486	492,5
425,8		427,4		499/497	
442,2		491,6		618/623	
428,5	437,1	486,4	492,0	623/623	622,3
440,7		498,0		624/623	
552,9		614,8		611/635	
553,6	549,5	629,3	620,1	625/625	625,7
542,1		616,2		630/628	

a) Vergleich von gaschromatographischer Methode (GC)
und enzymatischer Methode (E)

Die nach GC und E bestimmten Wertepaare sind in Abbildung 8 graphisch dargestellt. Aus Abbildung 8 und Tabelle 23 geht hervor, daß, insgesamt gesehen, die Bestimmung nach E höhere Werte liefert als die nach GC.

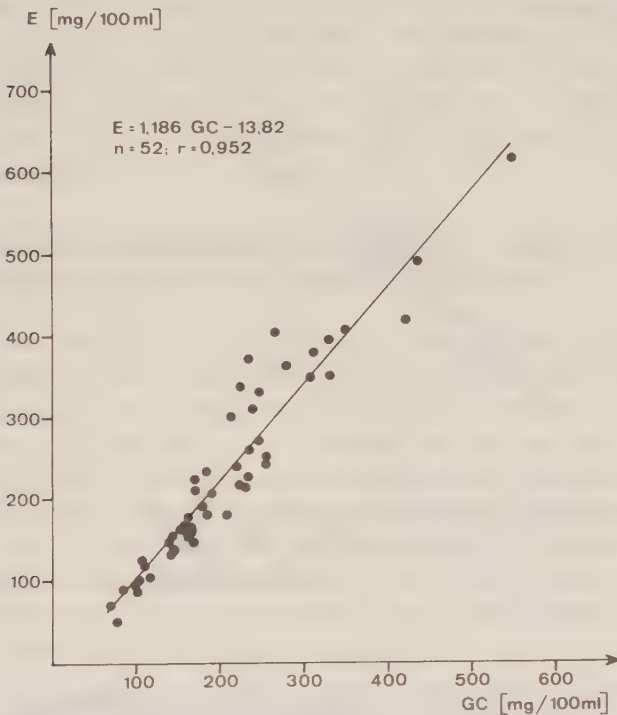


Abbildung 8: Korrelation zwischen der Bestimmung des Gesamtcholesterins nach GC und nach E
($s_{xy} = 36,58$)

In dem Konzentrationsbereich über 300 mg% (nach E bestimmt) wurden, von einer Ausnahme abgesehen, für E immer höhere Werte als für GC gefunden. In dem Konzentrationsbereich bis 300 mg% (nach E bestimmt) lieferte dagegen bei 37 untersuchten Seren in 17 Fällen GC höhere Werte als E.

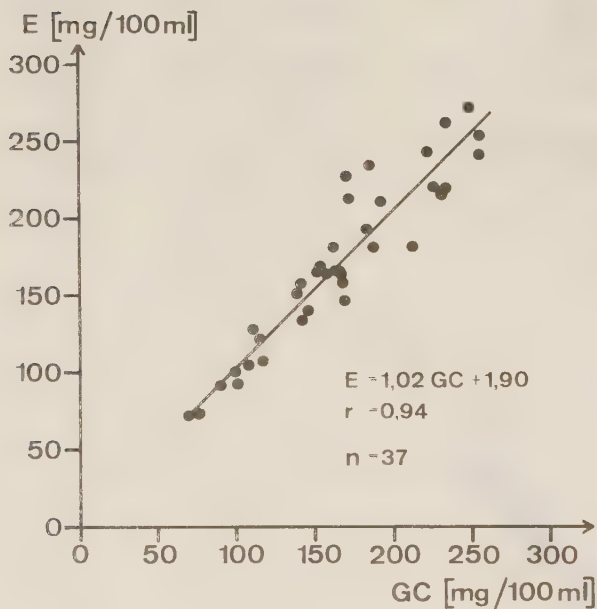


Abbildung 9: Korrelation zwischen der Bestimmung des Gesamtcholesterins nach GC und E im Konzentrationsbereich bis 300 mg% (nach E bestimmt)

$$(s_{xy} = 18,8)$$

Bei Berücksichtigung aller Werte lautet die Gleichung der Regressionsgeraden $E = 1,19 \text{ GC} - 13,82$. Die Korrelation der beiden Methoden ist mit $r=0,95$ noch als gut zu bezeichnen.

Ein anderes Bild ergibt sich, wenn man nur die Werte bis $300 \text{ mg}\%$ (nach E bestimmt) untersucht. Dieser Fall ist in Abbildung 9 dargestellt. Die Gleichung der Regressionsgeraden $E = 1,02 \text{ GC} + 1,90$ läßt erkennen, daß im Konzentrationsbereich bis $300 \text{ mg}\%$ (dies entspricht dem Normbereich der Methode) eine gute Spezifität für E besteht. Allerdings weichen einige Werte erheblich von der Regressionsgeraden ab, was sich in dem Korrelationskoeffizienten von $0,94$ niederschlägt.

b) Vergleich von gaschromatographischer Methode (GC)
und der Methode nach LIEBERMANN-BURCHARD (LB)

In Abbildung 10 sind die Wertepaare des Vergleiches GC gegen LB aufgetragen. Die Regressionsgerade hat die Gleichung $LB = 1,21 \text{ GC} - 3,77$; die Korrelation ist mit $r = 0,95$ noch als gut zu bezeichnen. Bei 52 untersuchten Proben ergab sich nur in einem einzigen Fall für LB ein niedrigerer Wert als für GC. Wie auch aus der Gleichung der Regressionsgeraden hervorgeht, liegen die nach LB bestimmten Werte im gesamten Bestimmungsbereich im Durchschnitt 20% höher als die nach GC gefundenen.

c) Vergleich von enzymatischer Methode (E) und der
Methode nach LIEBERMANN-BURCHARD (LB)

Die Beziehung der nach E und LB bestimmten Wertepaare ist in Abbildung 11 aufgetragen. Die zugehörige Regressionsgerade lautet $LB = 0,98 \text{ GC} + 20,51$;

die Korrelation ist mit $r = 0,97$ gut. Insgesamt gesehen wurden mit LB im Durchschnitt höhere Werte als mit E erhalten. Mit steigender Konzentration wird die durchschnittliche Differenz zwischen beiden Methoden immer

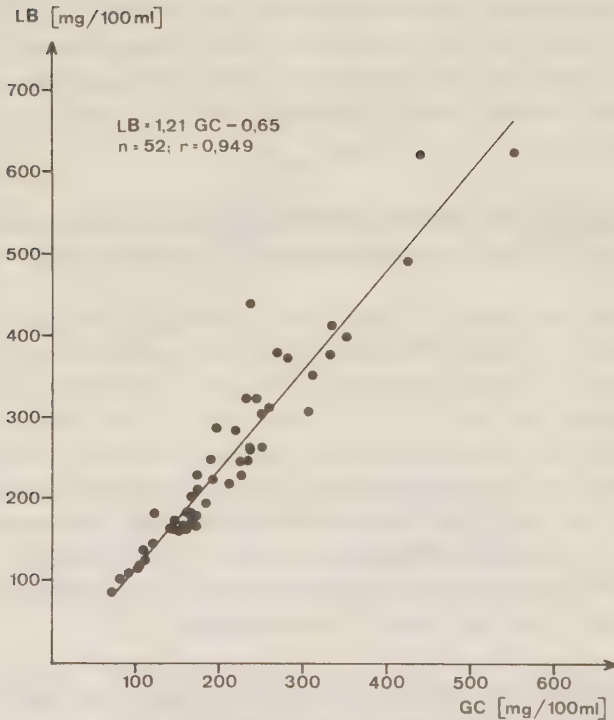


Abbildung 10: Korrelation zwischen der Bestimmung des Gesamtcholesterins nach GC und LB
($s_{xy} = 42,87$)

geringer, d.h. bei 100 mg% (nach E) liefert LB um 9 % höhere Werte als E, bei 200 mg% nur noch um 8 %, bei 300 mg% um 5 % und bei 400 mg% um 3 % höhere Werte.

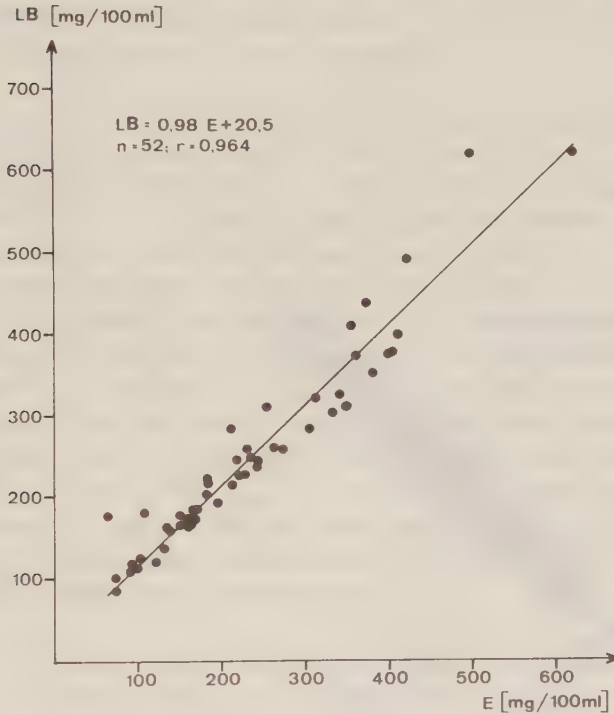


Abbildung 11: Korrelation zwischen der Bestimmung des Gesamtcholesterins nach E und LB
($s_{xy} = 30,56$)

Eine sehr gute Übereinstimmung hiermit zeigen die Ergebnisse, die beim Vergleich von 658 Seren (Einfachbestimmungen) gefunden wurden (Abbildung 12). Die Gleichung der Ausgleichsgeraden weicht mit $LB = 0,975 E + 22,89$ nur unwesentlich von der bei 52 Werten gefundenen ab.

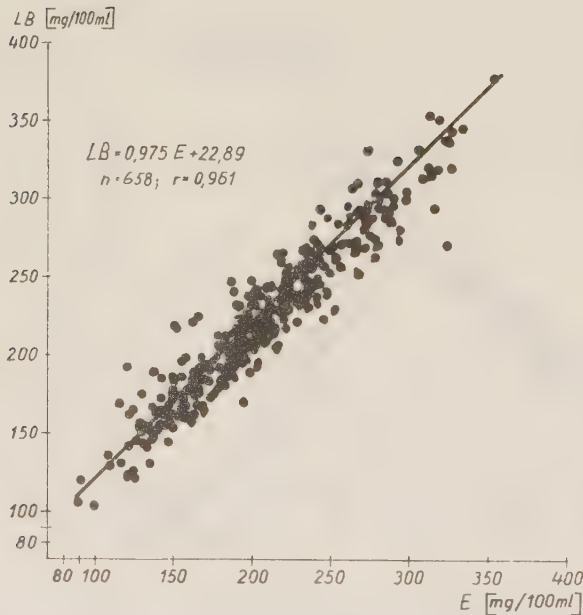


Abbildung 12: Korrelation zwischen der Bestimmung des Gesamtcholesterins nach E und LB (Einfachbestimmungen)

VI. DISKUSSION

=====

Die drei miteinander verglichenen Methoden zur Bestimmung des Serum-Cholesterinspiegels zeichnen sich durch unterschiedliche Spezifität aus. Die jeweilige Spezifität wurde bereits bei der Besprechung der einzelnen Verfahren genau untersucht.

Eine absolut spezifische Cholesterinbestimmung ist mit der gaschromatographischen Technik möglich. Der zur Berechnung herangezogene "Peak" wird, wie oben ausgeführt (s.S. 41) ausschließlich von Cholesterin hervorgerufen. Die Berücksichtigung des bei der Extraktion entstehenden Verlustes sowie Verbesserungen in der gaschromatographischen Technik machen die durchgeführte Methode erheblich aufwendiger als das ihr zugrunde liegende, von DRISCOLL et al. (15) beschriebene Verfahren. Der Mehraufwand macht sich in einer erheblichen Verbesserung der Präzision gegenüber der DRISCOLL-Technik bezahlt (s.S. 75). Die Anwendung der durchgeführten gaschromatographischen Methode in der täglichen Routinediagnostik steht wegen des großen Arbeitsaufwandes außer jeder Diskussion.

Absolute Spezifität und sehr gute Präzision lassen GC als Referenzmethode bei Methodenvergleichen geeignet erscheinen.

Die Methode nach LB hat die geringste Spezifität der drei Verfahren. Neben Cholesterin und Cholesterinestern werden mit der Methode auch andere Sterine und Steroide erfaßt, ferner Bilirubin und Hämoglobin sowie eine Gruppe weiterer, im Serum nur in geringen Mengen

vorhandener Substanzen (s.S. 18). Die Methode ist ziemlich störanfällig (Temperatur, Lichteinwirkung, Anwesenheit von Wasser und Lösungsmittel). Dies erklärt, daß die Präzision schlechter ist als bei E und GC. Durch die Miterfassung der unspezifischen Bestandteile werden mit LB Werte gefunden, die im Durchschnitt etwa 20 % über dem wahren Cholesterinspiegel liegen. Im angegebenen Normbereich (bis 250 mg%) ist die Methode hinreichend zuverlässig, bei höheren Konzentrationen ist die Abweichung von der Regressionsgeraden zum Teil recht erheblich.

Neben mangelnder Spezifität und großer Störanfälligkeit dürfte ein Hauptnachteil von LB in der Verwendung stark ätzender Reagenzien liegen. Der tägliche Umgang mit konzentrierter Schwefelsäure, Essigsäureanhydrid und Essigsäure sowie deren Dämpfe bedeutet für den betroffenen Personenkreis eine echte Gefährdung der Gesundheit.

Im Vergleich zu LB zeichnet sich die enzymatische Methode durch höhere Spezifität und geringere Störanfälligkeit aus. Die von RÖSCHLAU et al. (39) angegebenen Präzisionswerte mit einem Variationskoeffizienten von 2 % für die Bestimmung in der Serie und 3 % für die Bestimmung von Tag zu Tag wurden nicht ganz erreicht. Mit Variationskoeffizienten von 3 % in der Serie und 5 % von Tag zu Tag ist die erzielte Präzision jedoch immer noch als gut zu bezeichnen.

Bezüglich der Spezifität werden mit E noch alle Sterine und Steroide mit 5-en-3 β -ol-Konfiguration erfaßt. Deren Anteil im Serum ist nach RÖSCHLAU et al. (39) vernachlässigbar gering; im Gegensatz hierzu stehen Untersuchungen von ALLAIN et al. (2). Sie vertreten die Ansicht, daß bei der Bestimmung eines

"Normalserums" nach der enzymatischen Methode durch die Mitreaktion von 5a-Cholestan-3 β -ol, 5,7-Cholestadien-3 β -ol und 7-Cholesten-3 β -ol ein Wert gefunden wird, der um ca. 20 mg% über der wahren Cholesterinkonzentration liegt (s.S. 30). Weitere Untersuchungen hierüber stehen bislang aus.

Bei der Bestimmung des freien Cholesterins wurde eine sehr gute Übereinstimmung zwischen GC und E gefunden. Für die Mitreaktion der oben erwähnten Sterine liegt kein Anhaltspunkt vor. Dies könnte darauf beruhen, daß sie, analog dem Cholesterin, vorwiegend in veresterter Form vorliegen.

Für die Bestimmung des freien Cholesterins ist die enzymatische Methode in jeder Hinsicht ein echter Fortschritt gegenüber den bisher gebräuchlichen aufwendigen und störanfälligen Mehrstufenverfahren. Die leicht durchzuführende enzymatische Methode eröffnet die Möglichkeit zu breiter angelegten Untersuchungen über die Bedeutung des freien Cholesterins. Man muß abwarten, ob sich daraus eine Zunahme des Stellenwertes des freien Cholesterins als Parameter klinisch-chemischer Diagnostik ergibt.

Bei der Bestimmung des Gesamtcholesterins findet sich im Bereich bis 300 mg% eine sehr gute Übereinstimmung zwischen E und der Referenzmethode. Aus der Gleichung der Regressionsgeraden für diesen Bereich ($E = 1,02 \text{ GC} + 1,90$) geht hervor, daß E im Durchschnitt nur ganz gering höhere Werte liefert als GC. Die sehr geringe Differenz könnte durch die Mitreaktion der oben genannten unspezifischen Serumkomponenten hervorgerufen sein.

Deutlich höhere Werte als mit GC werden für E im Bereich über 300 mg% gefunden; bei 400 mg% (nach E) beträgt die Differenz etwa 15 %. Als Erklärung bietet sich wiederum die Miterfassung der oben aufgeführten Sterine an, die bei Seren mit sehr hohem Cholesterinspiegel ebenfalls sehr stark oder sogar überproportional erhöht sein könnten. Eine Klärung dieser Frage steht noch aus. Es sei angemerkt, daß es vom klinischen Bezug her gesehen unerheblich ist, ob bei einem Serum mit eindeutig zu hohem Cholesteringehalt dieser ganz genau oder um einige mg% zu hoch angegeben wird.

Der Vergleich von E und LB mit GC als Referenzmethode hat gezeigt, daß E eine höhere Spezifität und geringere Störanfälligkeit als LB aufweist, wenn auch nicht ganz in dem vom Hersteller angegebenen Maße. Der experimentelle Aufwand ist für E und LB etwa gleich. Ein großer Vorteil von E liegt in dem Wegfall der stark ätzenden Reagenzien der herkömmlichen Verfahren. Aufgrund der aufgeführten Vorteile ist zu erwarten, daß in nächster Zeit E mehr und mehr LB aus dem klinisch-chemischen Labor verdrängen wird.

VII. ZUSAMMENFASSUNG

=====

Nach einer kurzen Darstellung der klinischen Bedeutung der Bestimmung des Risikofaktors Cholesterin wird die Substanz selbst sowie ihr Vorkommen im Organismus beschrieben.

In einem allgemeinen Teil werden alle derzeit möglichen Verfahren zur Bestimmung des Serum-Cholesterinspiegels aufgeführt. Anhand der geschichtlichen Entwicklung wird ein Überblick über die auf der LIEBERMANN-BURCHARD'schen Reaktion beruhenden Methoden, sowie über enzymatische und gaschromatographische Verfahren gegeben.

Ein bekanntes gaschromatographisches Verfahren wurde modifiziert und dadurch in seiner Präzision erheblich verbessert; sehr hohe Präzision und absolute Spezifität machen dieses Verfahren (GC) als Referenzmethode geeignet.

Mit dieser Referenzmethode wurde das bislang im Zentrallaboratorium der Medizinischen Kliniken gebräuchliche Verfahren (LB) und eine neu eingeführte enzymatische Methode (E) verglichen.

Bei der Bestimmung des freien Cholesterins ergab sich bei 36 untersuchten Seren (Dreifachbestimmungen) im Konzentrationsbereich von 20-150 mg% eine sehr gute Spezifität und Präzision für E.

Bei der Bestimmung des Gesamtcholesterins wurde bei 52 untersuchten Seren im gesamten Konzentrationsbereich bis 650 mg% die bekannte Unspezifität und Störanfälligkeit von LB bestätigt.

Für E ergab sich im Bereich bis 300 mg% eine gute Spezifität. Im Bereich von 300 - 650 mg% wurden für E überhöhte Werte gefunden, die jedoch unter den nach LB ermittelten liegen. In Bezug auf Präzision und Praktikabilität ist E gegenüber LB überlegen. Insgesamt gesehen weist die Bestimmung des Serum-Cholesterinspiegels mit E erhebliche Vorteile gegenüber der Bestimmung mit LB auf.

VIII. ABKÜRZUNGEN

=====

ChOD	=	Cholesterinoxidase
cpm	=	registrierte Zerfälle (counts) pro Minute
$\overline{\text{cpm}}$	=	Mittelwert der cpm
E	=	enzymatische Methode
GC	=	gaschromatographische Methode
LB	=	Methode nach LIEBERMANN-BURCHARD
mg%	=	mg pro 100 ml
PH	=	"Peak"-Höhe
$\overline{\text{PH}}$	=	Mittelwert der PH
PHR	=	Verhältnis der "Peak"-Höhen ("peak" height ratio)
$\overline{\text{PHR}}$	=	Mittelwert der PHR
SD	=	Standardabweichung
st	=	Standard-Lösung
s_{xy}	=	Restvarianz
VK	=	Variationskoeffizient

IX. LITERATURVERZEICHNIS

=====

Die Zeitschriftennamen wurden nach den Empfehlungen der World Medical Association abgekürzt.

- 1 ABELL, L.L., LEVY, B.B., BRODIE, B.B. and KENDALL, F.E.:
A Simplified Method for the Determination of Total Cholesterol in Serum and Demonstration of Its Specificity, J. biol. Chem. 195, 357-366 (1952)
- 2 ALLAIN, C.C., POON, L.S., CHAIN, C.S.G., RICHMOND, W., and FL, P.C.:
Enzymatic Determination of Total Serum Cholesterol, Clin. Chem. 20/4, 470-475 (1971)
- 3 BEERTHUIS, R.K., and RECOURT, J.H.:
Sterol Analysis by Gas Chromatography. Nature 186, 372-374 (1960)
- 4 BLOMHOFF, J.P.:
Serum Cholesterol Determination by Gas - Liquid Chromatography. Clin.chim.Acta 42, 257-265 (1973)
- 5 BRIESKORN, C.H. und CAPUANO, L.:
Der Chemismus der Farbreaktionen nach Liebermann und Salkowski bei Triterpenen und Sterinen. Chem. Ber. 86, 866-873 (1953)
- 6 BUDECKE, E.:
Grundriss der Biochemie. Walter de Gruyter & Co., Berlin, 2. Aufl., 214-222 (1971)

- 7 BURCHARD, H.:
Beiträge zur Kenntnis des Cholesterins.
Chem. Zbl. 61, 25-27 (1890)
- 8 CARR, J.C., and DREKTER, I.J.:
Simplified Rapid Technic for the Extraction
and Determination of Serum Cholesterol
without Saponification. Clin. Chem. 2, 353-368 (1956)
- 9 CAWLEY, L.P., MUSSER, B.O., CAMPBELL, S., and
FAUCETTE, B.S.:
Analysis of total serum cholesterol by means of
gas-liquid chromatography.
Amer. J. clin. Pathol. 39, 450-455 (1963)
- 10 CLAUDE, J.R. et BEAUMONT, J.L.:
Les transformations de la molécule de cholestérol
in vitro - Leur importance au cours des analyses
chromatographiques.
J. Chromatog. 21, 189-201 (1966)
- 11 COOK, R.P.:
Cholesterol. Chemistry, Biochemistry and Pathology.
Academic Press Inc., New York (1958)
- 12 CURTIUS, H.-Ch. und BURGL, W.:
Gaschromatographische Bestimmung des Serumcholesterins. Z. klin. Chem. 4, 38-42 (1966)
- 13 DAACKE, H.J.:
Normalwerte für die Serum-Lipidfraktionen.
Med. Klin. 4, 131-135 (1967)
- 14 DELFS, F.:
Nahrungsfett-Blutlipide-Herzinfarkt.
Schleswig-Holsteinsches Ärzteblatt 22, 626-632 (1969)

- 15 DRISCOLL, J.L., AUBUCHON, D., DESCOTEAUX, M., and MARTIN, H.F.:
Semiautomated, Specific Routine Serum Cholesterol Determination by Gas-Liquid Chromatography.
Anal. Chem. 43, 1196-1200 (1971)
- 16 EBERHAGEN, D.:
Betrachtungen zur Bestimmung des Cholesterins im klinisch-chemischen Laboratorium.
Z. klin. Chem. 7, 167-174 (1969)
- 17 FLEGG, H.M.:
An Investigation of the Determination of Serum Cholesterol by an Enzymatic Method, Ann. clin. Biochem. 10, 79-84 (1973)
- 18 FRANEY, R.J., and AMADOR, E.:
Serum Cholesterol Measurement on Ethanol Extraction and Ferric Chloride-Sulfuric Acid.
Clin. chim. Acta 21, 255-263 (1968)
- 19 HENRY, R.J.:
Clinical Chemistry: Principles and Technics, Hoeber, New York, N.Y., 860 (1964)
- 20 HEYDEN, S.:
Ernährung und Herzinfarkt. In: Fettstoffwechselstörungen, Hrsg. v. G. SCHETTLER. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 1. Aufl., 95-123 (1971)
- 21 HEYDEN, S.:
Risikofaktoren für das Herz, Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim, 1. Aufl. (1974)

- 22 HUANG, T.C., CHEN, C.P., WEFLER, V., and RAFTERY, A.:
A Stable Reagent for the Liebermann-Burchard
Reaction. Anal. Chem. 33, 1405-1407 (1961)
- 23 IRSIGLER, K.:
Präventivmedizin bei Stoffwechselerkrankungen.
Wien. klin. Wschr. 85, 195 (1973)
- 24 KATTERMANN, R.:
Laboratoriumsdiagnostik der Fettstoffwechsel-
störungen. In: Störungen des Fettstoffwechsels.
Redaktion: P. SCHWANDT. Verlagsgesellschaft
Otto Spatz, München, 1. Aufl., 76-103 (1973)
- 25 KLEMENS, U. und V. LÖWIS, P.:
Hyperlipoproteinämie. Diagnostik und Klinik.
Henning Berlin GmbH, Berlin, 1. Aufl. (1973)
- 26 KUKSIS, A.:
Gas Chromatographic Fractionation of Natural
Steryl Ester Mixtures. Can. J. Biochem. 42,
407-417 (1964)
- 27 KUKSIS, A.:
Direct Gas Chromatographic Fractionation of Mixed
Natural Lipids of Natural Origin.
Can. J. Biochem. 42, 419-430 (1964)
- 28 LANGE, W., FOLZENLOGEN, R.G., and KOLP, D.G.:
Colorless Crystalline Perchloric and Hexafluorophos-
phoric Acid Salts of Sterols. The Color Formation
between Sterols and Perchloric Acid.
J. Am. chem. Soc. 71, 1733-1737 (1949)

- 29 LIEBERMANN, C.:
Ueber das Oxychinoterpen.
Ber. dtsch. chem. Ges. 18, 1803-1809 (1885)
- 30 LIFSCHÜTZ, J.:
Über die Oxidation des Cholesterins.
Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. 50, 436-439 (1907)
- 31 LYNEN, F.:
Cholesterol und Arteriosklerose.
Naturw. Rdsch. 10, 382-387 (1972)
- 32 NESS, A.T., PASTEWKA, J.V., and EACOCK, A.C.:
Evaluation of a Recently Reported Stable Liebermann-Burchard Reagent and its Use for the Direct Determination of Serum Total Cholesterol.
Clin. chim. Acta 10, 229-237 (1964)
- 33 O'NEILL, H.J., and GERSHBEIN, L.L.:
Determination of Cholesterol and Squalene by Gas Chromatography. Anal. Chem. 33, 182-185 (1961)
- 34 PEARSON, S., STERN, S., and MC GAVACK, T.:
A Rapid, Accurate Method for the Determination of Total Cholesterol in Serum. Anal. Chem. 25, 813-814 (1953)
- 35 RICHMOND, W.:
The Development of an Enzymic Technique for the Assay of Cholesterol in Biological Fluids
Scand. J. clin. Lab. Invest. 29, Suppl. 126, 3.24-3.28 (1972)
- 36 RICHMOND, W.:
Preparation and Properties of a Cholesterol Oxidase from *Nocardia* sp. and Its Application to the Enzymatic Assay of Total Cholesterol in Serum,
Clin. Chem. 19/12, 1350-1356 (1973)

- 37 RICHTERICH, R. und LAUBER, K.:
Bestimmung des Gesamt-Cholesterins im Serum.
Klin. Wschr. 40, 1252-1256 (1962)
- 38 RÖSCHLAU, P., BERNT, E. und GRUBER, W.:
Enzymatische Bestimmung des Gesamt-Cholesterins
im Serum. Z.klin.Chem. 12, 226 (1974)
- 39 RÖSCHLAU, P., BERNT, E. und GRUBER, W.:
Enzymatische Bestimmung des Gesamt-Cholesterins
im Serum. Erweiterte Fassung des Autorenreferates
aus: Z. Klin. Chem. Klin. Biochem. 12, 226 (1974)
Als Nachdruck herausgegeben von Boehringer
Mannheim GmbH (1974)
- 40 SALKOWSKI, E.:
Kleinere Mitteilungen physiologisch-chemischen
Inhalts (II). 1. Die Reaction des Cholesterins
mit Schwefelsäure.
Pflügers Arch. ges. Physiol. 6, 207-209 (1872)
- 41 SCHATZ, A., SAVARD, K., and PINTER, I.J.:
The Ability of Soil Microorganisms to Decompose
Steroids, J. Bact. 58, 117-125 (1949)
- 42 SCHLIERF, G.:
Zusammenhänge zwischen Ernährung und Herz- und
Gefäßkrankheiten. Ernährungsumschau 14,
405-410 (1967)
- 43 SCHLIERF, G.:
Diätbehandlung von Hyperlipidämien. In: Fettstoff-
wechselstörungen. Hrsg. v. G. SCHETTLER. Georg
Thieme Verlag, Stuttgart, 1. Aufl., 48-77 (1971)

- 44 SCHLIERF, G.:
Hyperlipoproteinämie. Diätetische Behandlung.
Henning Berlin GmbH, Berlin, 1. Aufl. (1973)
- 45 SCHÖN, H. und GEY, F.:
Zur elutionschromatographischen Trennung des
freien und veresterten Cholesterins in Organ-
und Serumfetten und direkten kolorimetrischen
Bestimmung.
Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. 303, 81-90 (1956)
- 46 SCHÖNHEIMER, R. und DAM, H.:
Über die Spaltbarkeit und Löslichkeit von Sterin-
digitoniden.
Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. 215, 59-63 (1933)
- 47 SCHOENHEIMER, R., and SPERRY, W.M.:
A Micromethod for the Determination of Free and
Combined Cholesterol.
J. biol. Chem. 106, 745-760 (1934)
- 48 SCHWANDT, P.:
Zur Prophylaxe der Arteriosklerose.
Internist 14, 325-329 (1973)
- 49 SMITH, A.G., and BROOKS, C.J.W.:
Application of Cholesterol Oxidase in the
Analysis of Steroids.
J. Chromatog. 101, 373-378 (1974)
- 50 SPERRY, W.M., and WEBB, M.:
A Revision of the Schoenheimer-Sperry Method for
Cholesterol Determination.
J. biol. Chem. 187, 97-106 (1950)

- 51 STADTMAN, T.C., CHERKES, A., and ANFINSEN, C.B.:
Studies on the Microbiological Degradation of
Cholesterol. J. biol. Chem. 206, 511-523 (1954)
- 52 STÄHLER, F., MUNZ, E. und KATTERMANN, R.:
Enzymatische Bestimmung von Gesamt-Cholesterin
im Serum, Dtsch. med. Wschr. 100, 876-887 (1975)
- 53 STAMLER, J.:
Ernährung-zugut und zu fett rächt sich.
Weltgesundheit 2, 26-31 (1970)
- 54 STAMM, D.:
Spezifität von Analysenmethoden. in: LANG, H.,
RICK, W. und ROKA, L.: Optimierung der Diagnostik,
Springer-Verlag, Berlin, 1. Aufl., 187-210 (1973)
- 55 SWEeley, C.C., and HORNING, E.C.:
Microanalytical Separation of Steroids by Gas
Chromatography. Nature, 197, 144-145 (1960)
- 56 SWEeley, C.C., and CHANG, T.-C.L.:
Gas Chromatography of Steroids.
Anal. Chem. 33, 1860-1863 (1961)
- 57 TSCHUGAEFF, L. und GASTEFF, A.:
Zur Kenntnis des Cholesterins.
Ber. dtsch. chem. Ges. 42, 4631-4634 (1909)
- 58 VANDEN HEUVEL, W.J.A., SWEeley, C.C., and HORNING,
E.C.: Separation of Steroids by Gas Chromatography.
J. Am. chem. Soc. 82, 3481-3482 (1960)
- 59 WATSON, D.:
A Simple Method for the Determination of Serum
Cholesterol.
Clin. chim. Acta 5, 637-643 (1960)

- 60 WEBSTER, D.:

The Determination of Total and Ester Cholesterol
in Whole Blood, Serum or Plasma.

Clin. chim. Acta 7, 277-284 (1962)

- 61 WEIZEL, A.:

Cholesterin - Stoffwechsel und ernährungs-
physiologische Bedeutung. In: Fettstoffwechsel-
störungen. Hrsg. v. G. SCHETTLER. Georg Thieme
Verlag, Stuttgart, 1. Aufl., 78-94 (1971)

- 62 WINDAUS, A.:

Über die Entgiftung der Saponine durch Cholesterin.
Ber. dtsch. chem. Ges. 42, 238-246 (1909)

- 63 WINDAUS, A.:

Über die quantitative Bestimmung des Cholesterins
und der Cholesterinester in einigen normalen und
pathologischen Nieren.

Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. 65, 110-117 (1910)

- 64 WITTE, D.L., BARRETT II, D.A., and WYCOFF, D.A.:

Evaluation of an Enymatic Procedure for Determi-
nation of Serum Cholesterol with the Abbott ABA-100,
Clin. Chem. 20/10, 1282-1286 (1974)

- 65 WRIGHT, L.A., TONKS, D.B., and ALLEN, R.H.:

Determination of Cholesterol with Special Reference
to the Use of p-Toluenesulfonic Acid.

Clin. Chem. 6, 243-253 (1960)

- 66 ZAK, B., MOSS, N., BOYLE, A.J., and ZLATKIS, A.:

Reactions of Certain Unsaturated Steroids with
Acid Iron Reagent.

Anal. Chem. 26, 776-777 (1954)

- 67 ZLATKIS, A., ZAK, B., and BOYLE, A.J.:

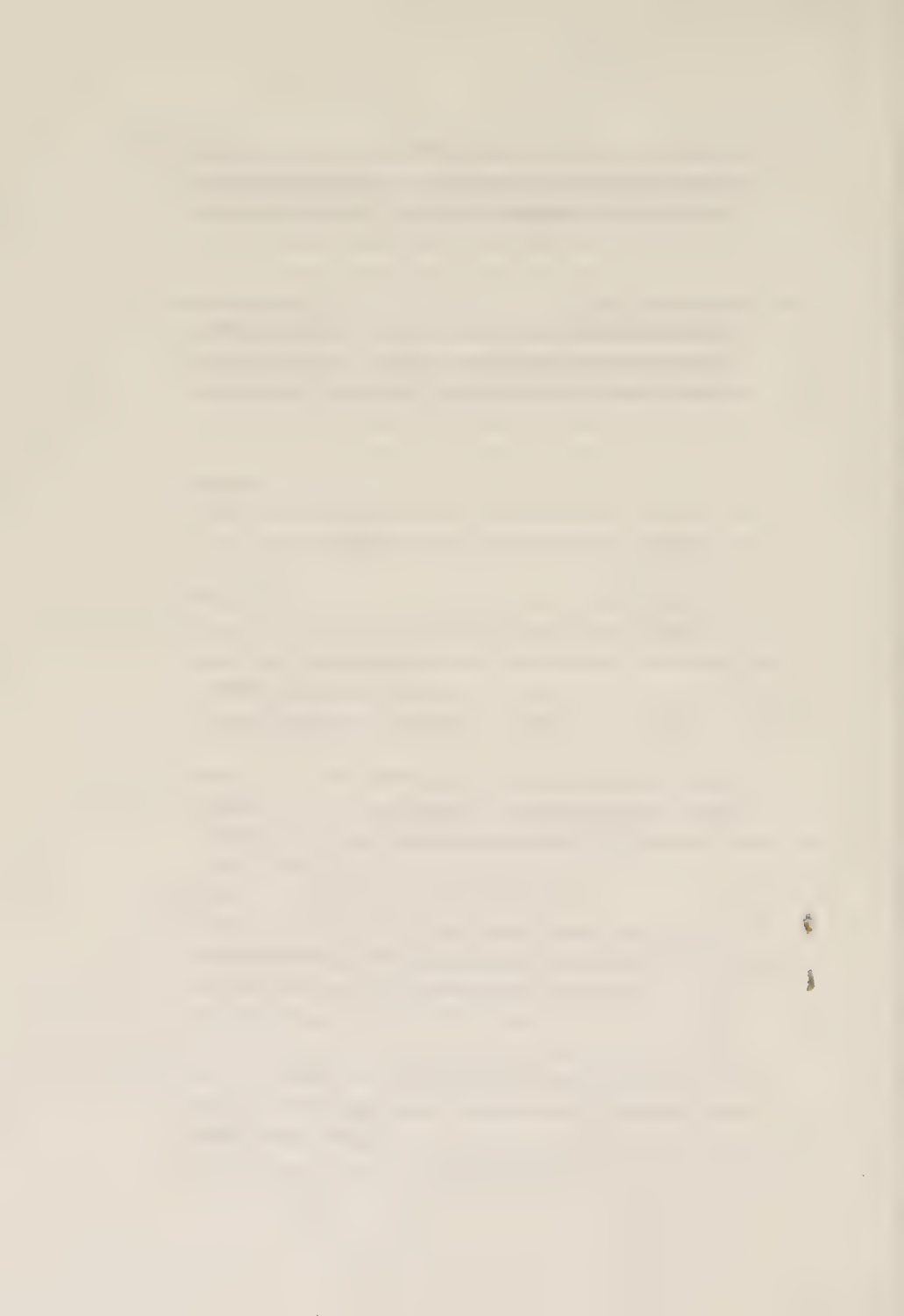
A New Method for the Direct Determination of
Serum Cholesterol.

J. Lab. clin. Med. 41, 486-492 (1953)

- 68 ZURKOWSKI, P.:

A Rapid Method for Cholesterol Determination
with a Single Reagent.

Clin. Chem. 10, 451-453 (1964)



Die vorliegende Arbeit wurde auf Anregung und unter der Anleitung von

Herrn Professor Dr. D. Lommer

in der Zeit von April 1974 bis Oktober 1975 in den Klinisch-Biochemischen Laboratorien der I. Medizinischen Klinik und Poliklinik der Johannes Gutenberg-Universität durchgeführt.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Professor Dr. D. Lommer für die ständige Hilfsbereitschaft und freundliche Unterstützung bei der Durchführung dieser Arbeit.

Herrn Assistenz-Professor Dr. K. Sinterhauf danke ich für sein stetes Interesse und die bereitwillige Hilfe.

Herrn Professor Dr. W. Prellwitz danke ich für die Möglichkeit, die Cholesterinbestimmungen nach LIEBERMANN-BURCHARD in seinen Laboratorien ausführen zu lassen.

Ebenso gilt mein Dank Frau M. Wies für die zukommende und gewissenhafte Durchführung der Cholesterinbestimmungen nach LIEBERMANN-BURCHARD.



LEBENS LAUF

Am 10. November 1951 wurde ich als Sohn des Industriekaufmannes Herbert Schreyer und dessen Ehefrau Anna, geb. Keller, in Wiesbaden geboren.

Von 1958 - 1962 besuchte ich die Volksschule in Wiesbaden-Schierstein, anschließend die Gutenbergschule in Wiesbaden. Dort legte ich am 15. Juni 1970 im neusprachlichen Zweig das Abitur ab.

Zum Wintersemester 1970/71 begann ich an der Johannes Gutenberg-Universität Mainz mit dem Medizinstudium. Am 4.10.1971 bestand ich die Naturwissenschaftliche Vorprüfung, am 22.3.1973 die Ärztliche Vorprüfung, beide Male mit der Note "sehr gut". Nach dem Wintersemester 1975/76 werde ich die Ärztliche Prüfung ablegen.



